

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad DAHLAB BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCÉDES

Spécialité : Pharmacie Industrielle

Intitulé du mémoire

**Elaboration d'un pansement cicatrisant à
base de l'huile essentielle du *Teucrium
polium* L (khiyata)**

Présenté par :

Mlle. Boumaza Nourelhouda

Encadré par :

Pr. Hadj-Ziane Amel

Dr. Timizar Zineb

Promotion 2024

الملخص :

يعد هذا العمل مساهمة في تطوير النباتات الطبية المستخدمة في الطب التقليدي. تنتمي نبتة *Teucrium polium L* إلى الفصيلة Lamiaceae وتعتبر من النباتات ذات الخصائص العلاجية الهامة.

ويتعلق الجزء الأول من هذه الدراسة باستخلاص الزيت العطري من الأجزاء الهوائية لنبات *T. polium* بالتقطير المائي. وقد تم تحديد التركيب الكيميائي للزيت العطري عن طريق GC-MS. تم إثبات النشاط العالي المضاد للأوكسدة من خلال طريقة كسح الجذور الحرة DPPH مع $IC_{50}=10.314$ ug/mL. تم تقييم التأثير المضاد للبكتيريا، في المختبر، بطريقة الانتشار القرصي، باستخدام المضادات الحيوية القياسية والتخفيف الجزئي

في وسط أجار، أظهرت النتائج نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد الجراثيم الموجبة للجرام مع $CMI=2.5$ ug/mL. حُصص الجزء الثاني لصياغة المستحلبات النانوية الزيتية في الماء. كشفت النتائج أنه تم الحصول على مستحلبات نانوية مرغوبة أكثر بأحجام جسيمات $(65 \pm 0.5$ nm) و $ZP (30 \pm 0.5$ mV) و $PDI (0.35 \pm 0.05)$.

أنتجت التركيبة المثلى رقعة عبر الجلد بخصائص مماثلة لتلك الموجودة في الرقع التجارية. أخيراً، تم إثبات إمكانية التئام الجروح من خلال الاختبارات في الجسم الحي. أظهرت النتائج أن العلاج المقترح سرع بشكل كبير من التئام الجروح وأدى إلى إعادة الاندماج والتجدد الكامل للبشرة بعد 15 يوماً من العلاج.

الكلمات الرئيسية: *Teucrium polium L*، نشاط مضاد للبكتيريا، نشاط مضاد للأوكسدة، مستحلب نانوي، رقعة عبر الجلد، نشاط علاجي.

Abstract :

This work is a contribution to the development of medicinal plants used in traditional medicine. *Teucrium Polium L* belongs to the Lamiaceae family is considered to be a plant with important therapeutic properties.

The first part of this study concerns the extraction of the essential oil from the aerial parts of *T. polium* by hydro-distillation. The chemical composition of the EO was determined by GC-MS. The high antioxidant activity was demonstrated by the DPPH free radical scavenging method with $IC_{50}=10.314$ ug/mL. The antibacterial effect was evaluated, in vitro, by the disk diffusion method, using the standard antibiogram and micro-dilution in agar medium, the results showed an antibacterial activity against Gram positive with MIC of 2.5 ug/mL.

The second part was devoted to the formulation of oil-in-water nanoemulsions. The results revealed that more desirable TP-NEs with particle sizes $(65 \pm 0.5$ nm) and PDI (0.35 ± 0.05) and a ZP $(30 \pm 0.5$ mV) were obtained. The optimal formulation produced a transdermal patch with properties comparable to those of commercial products. Finally, the potential for wound healing was demonstrated by in vivo tests. The results showed that the proposed treatment considerably accelerated wound healing and led to complete re-epithelialization and epidermal regeneration during 15 days of treatment.

Key words: *Teucrium polium L*, antibacterial activity, antioxidant activity, nanoemulsion, transdermal patch, healing activity.

Résumé :

Ce travail est une contribution à la valorisation des plantes médicinales, utilisées en médecine traditionnelle. *Teucrium Polium L* de la famille Lamiaceae considérée comme une plante ayant des vertus thérapeutiques importantes.

La première partie de cette étude concerne l'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. polium* par hydro-distillation. La composition chimique de l'HE a été réalisée par GC-MS. La forte activité antioxydante a été démontrée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH avec $IC_{50}=10,314$ ug/mL. L'effet antibactérien a été évalué, in vitro, par la méthode de diffusion sur disque, en utilisant l'antibiogramme standard et la micro-dilution en milieu gélosé, les résultats ont montré une activité antibactérienne contre le Gram positif avec CMI de 2.5 ug/mL.

La deuxième partie a été dédiée à la formulation des nanoémulsions huile dans eau. Les résultats ont révélé que des TP-NEs plus souhaitables avec des granulométries $(65 \pm 0,5$ nm) et PDI $(0,35 \pm 0,05)$ et un ZP $(30 \pm 0,5$ mV) ont été obtenus.

La formulation optimale réalisée a permis d'élaborer un patch transdermique ayant des propriétés comparables à celles commerciaux. Enfin le potentiel de cicatrisation des plaies a été prouvé par des tests in vivo. Les résultats ont montré que le traitement proposé a considérablement accéléré la cicatrisation de la plaie et a conduit à une réépithélialisation et une régénération épidermique complète pendant 15 jours de traitement.

Mots clés : *Teucrium polium L*, activité antibactérienne, activité antioxydante, Nanoémulsion, patch transdermique, activité cicatrisante.

AVANT PROPOS

Toute ma gratitude, grâce et remerciements vont en premier lieu à ALLAH notre créateur et maître de l'univers, de m'avoir donné le courage, la santé, la force afin d'arriver à la finalité de ce modeste travail.

*Je remercie très chaleureusement mes deux encadrateurs **Pr. Hdj-Ziane** et **Dr. Timizar** d'avoir accepté de m'encadrer, initié et guidé sur le chemin de la science ainsi que pour la grande confiance qu'elles m'ont accordée, toujours avec patience et d'incalculables conseils. Merci de m'avoir transmis votre savoir et savoir-faire précieux. C'est avec une profonde reconnaissance et considération particulière que je remercie le personnel du Laboratoire de génie chimique. Apprendre à vos côtés a été une de mes expériences les plus fructueuses. Merci pour votre accueil, ainsi que votre motivation.*

Je tiens aussi à remercier sincèrement le président de jury et les honorables membres de jury pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et pour l'intérêt porté à mes travaux. Merci pour le temps consacré et les critiques constructives qui vont permettre d'améliorer ma contribution.

*J'adresse mes sincères remerciements à tous les Professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé ma réflexion et ont accepté de me rencontrer et répondre à mes questions durant ma recherche, à **Mr Hattab** et **Mr Boutoumi** ainsi l'ensemble des enseignants du département de génie des procédés qui ont contribué à ma formation de master en pharmacie industrielle. J'adresse également mes sincères remerciements à tous les ingénieurs des laboratoires de département, à **Mr Rachid**, je vous remercie pour votre accueil et votre disponibilité.*

*Mes remerciements vont pour tous ceux ou celles qui m'ont apporté leur soutien et qui m'ont aidé de loin ou de près pour l'achèvement de ce travail. En particulier ma famille **BOUMAZA**, mes parents qui m'ont soutenu beaucoup pendant toute la vie et qui continueront à m'aider dans tous les projets de l'avenir.*

DEDICACES

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut pour m'exprimer à dédier ce modeste travail qui est le fruit de plusieurs années d'étude. Du fond de mon cœur, je le dédie à :

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma profonde estime. Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulé, le fruit de tes innombrables sacrifices.

A MON TRÈS CHER PÈRE : L'homme de ma vie, mon exemple éternel. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience, et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

Puisse le tout puissant vous donnez santé, longue vie afin que je puisse vous comblez à mon tour.

A MA CHERE SŒUR, la prunelle de mes yeux, au cœur si grand, ***MON PETIT FRÈRE*** que j'adore. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

A MA GRAND MÈRE maternelle chérie. Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur. Je te remercie pour tout le soutien et l'amour que tu me porte depuis mon enfance, ta prière m'a été d'un grand secours tout au long de ma vie. Puisse dieu tout puissant, te préserve et t'accorde santé longue vie et bonheur.

A MES CHERES TANTES : qui m'avez toujours soutenue et encouragé durant ces années d'études. Aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments et d'amour, d'attachement que j'éprouve à votre égard. Puisse dieu vous protéger, garder.

A MES CHERS COUSINS COUSINES.

A MES MEILLEURES AMIS : CHIZLANE, Tu es la meilleure amie que je puisse avoir. ***WAIL,*** mon ami d'enfance. ***NAOUEL,*** merci d'être toujours là pour moi. Une belle et grande amitié qui ne se s'arrêtera jamais. En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

A MES AMIS DE TOUJOURS. Merci à tous ceux que je n'ai pas mentionnés (pas par oubli, mais par faute de temps... !).

Nourelhouda

TABLE DES MATIERES

Résumé

Avant Propos

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviation

Introduction générale

Etat de l'art1

Chapitre I : *TEUCRIEM POLIUM L*

I.1 Introduction4

I.2 Les métabolites secondaires.....4

I.2.1 Les huiles essentielles4

I.2.1.1 Localisation des huiles essentielles5

I.2.1.2 Composition chimique des huiles essentielles5

I.2.1.3 Propriétés physico-chimiques6

I.3 Présentation du taxon étudié : *Teucrium polium L*7

I.4 Conclusion10

Chapitre II : *LES NANOEMULSIONS*

II.1 Introduction.....11

II.2 Définition des nanoémulsions.....	11
II.3 Les différents types de nanoémulsions.....	11
II.4 Propriétés physico-chimiques des nanoémulsions.....	12
II.5 Formulation des nanoémulsions.....	12
II.5.1 Méthode d'émulsification à haute énergie.....	12
II.5.2 Méthodes d'émulsification à faible intensité d'énergie.....	14
II.6 Mécanismes de déstabilisation.....	15
II.6.1 Murissement d'Ostwald.....	16
II.6.2 Agrégation des gouttelettes.....	16
II.6.3 Séparation gravitationnelle.....	16
II.7 Contrôle de la stabilité.....	17
II.7 Les techniques de caractérisation des nanoémulsions pharmaceutiques.....	18
II.7.1 Analyse granulométrique.....	18
II.7.2 Comportement rhéologique.....	19
II.7.3 Cinétique de diffusion Ex-vivo.....	19
II.8 Conclusion.....	19

Chapitre III : *PATCHS TRANSDERMIQUES*

III.1 Introduction.....	20
III.2 Définition.....	20
III.3 Délivrance transdermique des médicaments.....	21

III.3.1 La diffusion transdermique.....	21
III.4 Structure de la peau.....	23
III.5 Intérêt de la voie transdermique.....	24
III.6 Conclusion.....	25

Chapitre IV : MATERIEL ET METHODES

IV .1 Introduction.....	26
IV.2 Matériel biologique	26
IV.2.1 Extraction des huiles essentielles.....	26
IV.2.2 Calcul du rendement de l'extraction.....	27
IV.2.3 Analyse de l'huile essentielle.....	27
IV.2.4 Evaluation des activités biologiques	28
IV.2.4.1 Activité antioxydante.....	28
IV.2.5 Activité antibactérienne.....	30
IV.3 Formulation des nano-émulsions.....	32
IV.3.1 Caractérisation des nano-émulsions.....	33
IV.4 Préparation des patchs.....	34
IV.4.1 Caractérisations des patchs.....	35
IV.5 Activité cicatrisante in vivo.....	36
IV.6 Conclusion.....	38

Chapitre V : RESULTATE ET DISCUSSIONS

V.1 Introduction.....	39
V.2 Rendement d'extraction	39
V.2.1 Analyse de l'huile essentielle.....	39
V.3 Etude des paramètres biologiques biologique.....	42

V.3.1 Evaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH.....	42
V.3.2 Activité antibactérienne.....	44
V.4 Formulation de nano-émulsion.....	45
IV.4.1 Caractérisation des nano-émulsions.....	45
V.5 Préparation des patches	49
V.5.1 Caractérisations des films.....	49
V.6 Activité cicatrisante in vivo.....	52
V.6.1 Evaluation de l'aspect macroscopique des plaies.....	52

Conclusion

Références

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : TEUCRIEM POLIUM L

Figure 1 : Photo de <i>Teucrium polium L</i>	8
---	----------

Chapitre II : LES NANOEMULSIONS

Figure 1 : Les différents types de structures de nanoémulsions.....	12
Figure 2 : Schéma du fonctionnement d'un homogénéisateur à haute pression.....	13
Figure 3 : Sonde à ultrasons.....	13
Figure 4 : Représentation du principe de la microfluidisation.....	13
Figure 5 : Représentation du procédé de l'émulsification par membrane.....	14
Figure 6 : Illustration du phénomène d'émulsification spontanée.....	14
Figure 7 : Illustration de la formation de nanoémulsions par la méthode PIT	15
Figure 8 : Illustration de la méthode PIC.....	15
Figure 9 : Mûrissement d'Ostwald.....	16
Figure 10 : Illustration des phénomènes de séparation gravitationnelle.....	17
Figure 11 : Schéma d'une cellule de Franz	19

Chapitre III : PATCHS TRANSDERMIQUES

Figure 1 : types de patchs transdermiques... ..	21
Figure 2 : Structure de la peau humaine	23

Figure 3 : Route de pénétration des molécules à travers la peau	24
--	-----------

Chapitre IV : MATERIEL ET METHODES

Figure 1 : photo du montage expérimental d'extraction de l'huile essentielle.....	27
Figure 2 : Réaction entre le radical DPPH• et l'antioxydant pour former DPPH stable.	29
Figure 3 : Illustration de la méthode d'aromatogramme	31
Figure 4 : Conditionnement des rats	37
Figure 5 : Préparation du site opératoire.....	37
Figure 6 : Excision d'une plaie	38

Chapitre V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure 1 : courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'HE... ..	43
Figure 2 : Comportement viscoélastique de la NEs.....	46
Figure 3 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement.....	48
Figure 4 : Profil de libération de l'HE à travers NEs.....	49
Figure 5 : Exemple d'une photo prise sur un film à base d'CMC/Gel/PVA	50
Figure 6 : Adhésion des patchs sur le derme, (a) : patch collé et(b) : décollement du patch...	50
Figure 7 : Spectres IR-TF de film et du patch	51
Figure 8 : Profil de libération du patch	52
Figure 9 : Aspect des plaies de lot traité avec patch	54

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre III : LES PATCH TRASDERMIQUES

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des techniques de promotion de diffusion.....	22
---	-----------

Chapitre IV : MATERIEL ET METHODES

Tableau 1 : Liste des souches testées.....	30
Tableau 2 : Formulations des NEs.....	33
Tableau 3 : Différentes formulations des films préparés.....	35

Chapitre V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 1 : Composition chimique d'HE de <i>T. polium</i>	40
Tableau 2 : la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.....	42
Tableau 3 : la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'HE.....	42
Tableau 4 : Diamètre des zones d'inhibition (mm).....	44
Tableau 5 : Propriétés visuelles et tactiles des films choisis.....	49
Tableau 6 : Pourcentage de contraction des plaies à j18 (%).....	53

LISTE DES ABREVIATIONS

- *CFI* : Concentration minimale inhibitrice.
- *CPG* : Chromatographie en phase gazeuse.
- *CMC* : Carboxyméthyle cellulose.
- *DLS* : Diffusion dynamique de la lumière.
- *DPPH* : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil.
- *DMSO* : Diméthyle sulfoxyde.
- *FDA* : Food and drug administration.
- *FT-IR* : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.
- *Gel* : Gélatine.
- *HE* : Huile essentielle.
- *HPH* : Homogénéisation à haute pression.
- *IUPAC* : Union internationale de chimie pure et appliquée.
- *IC 50* : Concentration inhibitrice médiane.
- *MH* : Muller Hinton.
- *NEs* : Nanoémulsions.
- *PA* : Principe actif.
- *PI* : Indice de polydispersité.
- *PIC* : Inversion de phases par la composition.
- *PIT* : Température d'inversion de phases.
- *PVA* : Alcool polyvinylique.
- *PS* : Polystyrène.
- *Pa* : Pascale.
- *TA* : Tension actif.
- *TPO* : Huile essentielle de *T.polium*.
- *UFC* : Unité format colonie.
- *UV* : Ultra violet.
- *TMN* : Lot témoin (Non traité).
- *CCT* : Lot traité avec médicament de référence Cicatryl-bio.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité pour leurs extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme sont très anciennes et ont toujours été réalisées de façon arbitraire. [1]

Au fil des siècles, les traditions humaines ont su développer les connaissances et les utilisations des plantes médicinales, toutes ont pour objectifs de soulager la souffrance et d'améliorer la santé des Hommes. [2]

Les composés actifs produits au cours du métabolisme végétal secondaire sont généralement responsables des propriétés biologiques. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré comment ces substances agissent en tant qu'antioxydants, stimulants de la digestion et hypolipémiants et ont prouvé leurs activités antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires et anti-cancérigènes. Ces effets physiologiques bénéfiques peuvent également présenter des applications préventives dans diverses maladies. [3]

L'Algérie, de par sa position biogéographique offre une très grande diversité écologique et floristique, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% sont endémiques et qui restent très peu explorées, autant d'un point de vue phytochimique que pharmacologique [4]. Parmi ces ressources naturelles, le *Teucrium polium*, auquel les populations locales attribuent certaines propriétés médicinales. Elle est utilisée pour traiter différents états pathologiques tels que les troubles gastro-intestinaux, les inflammations, les infections bactériennes, l'accélération de la cicatrisation des blessures et des plaies, le diabète et les rhumatismes [5]. Néanmoins la sensibilité des extraits de plantes aux facteurs externes constitue un obstacle majeur pour leur utilisation comme principes actifs dans les médicaments, ce qui a incité les chercheurs à s'orienter vers des moyens de protection de ces composés.

A l'heure actuelle ou de nouvelles prospections au niveau de l'organisme et la conception de nouveaux équipements d'analyses ont concouru à la recherche de nouvelles formulations, les micro et les nanoparticules permettant d'une part de protéger le PA et d'améliorer les conditions de sa conservation et d'autre part d'avoir une

concentration précise et utile de ce principe actif au sein de l'organisme et de cibler d'une manière très judicieuse les cellules visées.

La conception et la préparation des nanoémulsions ont suscité un vif intérêt dans les applications pharmaceutiques en raison de leur structure chimique et physique ajustable, de leur libération contrôlée, de leur avantage par rapport aux formes conventionnelles.

L'objectif principal de ce mémoire consiste à valoriser cette espèce très répandue dans notre pays en réponse à la stratégie des projets socio-économique. L'activité cicatrisante miraculeuse citée dans la littérature dans les soins traditionnels des blessures nous a incité à concevoir un patch transdermique enrichi en matières actives extraites du *T.polium*.

Afin de développer si l'utilisation de ce patch permettra une cicatrisation rapide, efficace et une bonne protection esthétique.

Pour répondre à la problématique proposée ? Nous essayerons à travers ce travail de répondre à la question, méthodiquement dans le cadre de ce manuscrit qui est structuré en cinq chapitres plus une introduction et une conclusion générale.

Dans l'introduction générale nous donnons le contexte de l'étude ainsi que l'organisation de la recherche.

Les **trois premiers chapitres** sont consacrés à l'étude bibliographique comportant un rappel sur le taxon étudié, la description ainsi les activités biologiques, la Présentation de l'espèce étudié *Teucrium Polium L*, Les Nano-Emulsions et les Patches Transdermiques.

Dans **le quatrième** chapitre, nous nous intéressons à décrire la méthodologie suivie pour l'extraction de l'huile essentielle, les tests d'activité antioxydante, antimicrobienne ainsi que pour l'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS). En commençant par l'évaluation des activités biologiques de l'huile essentielle jusqu'à l'encapsulation dans des nanoémulsions huile dans eau et les caractériser.

A cet effet, un système innovant permettant une délivrance transdermique avec les meilleures capacités de libération a été proposé. Ses caractéristiques pharmacologiques

et l'efficacité thérapeutique de la formulation ont été réalisées par l'étude de la diffusion transdermique **ex-vivo**. L'évaluation de l'activité cicatrisante a été réalisée par des études **in-vivo** sur des rats Wistar. Dans le chapitre **cinq**, nous avons procédé à une discussion des résultats pour la formulation étudiée.

Le présent mémoire se terminera, par une conclusion générale. Cette dernière, comprend les principaux résultats présentés ainsi que quelques recommandations à la présente étude, une bibliographie, ont été également présentées à la fin de ce mémoire.

ETAT DE L'ART

ETAT DE L'ART

Les plantes possèdent des extraordinaires vertus thérapeutiques. Leur utilisation pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne et a toujours été faite de façon empirique.

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Ci-après, quelques travaux réalisés avec le *teucrium polium* durant les cinq dernières années.

En 2023 : Haifa Chtourou et al, ont réalisé deux méthodes d'extraction utilisant des solvants de polarités croissantes. Les activités biologiques des extraits ont été étudiées à l'aide de tests in vitro antioxydants et antibactériens. Le potentiel de la plante pour la cicatrisation des plaies a également été étudié. L'application de poudre de *T. polium* comme pommade sur la peau de rat blessée a considérablement amélioré la cicatrisation de la plaie et a conduit à une réépithélialisation complète et à une régénération épidermique complète [6].

En 2022 : Sabz Gh et al, ont évalué l'effet de l'huile essentielle de *T. polium* contre les souches fongiques, bactériennes et *Giardia lamblia*. L'analyse chimique de l'huile essentielle a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. En général, l'effet de l'huile essentielle sur les espèces non-albicans était meilleur que celui des isolats de *C. albicans*. En outre, l'huile essentielle a présenté un effet inhibiteur sur *E. coli* et *Klebsiella* mais n'a pas affecté *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. Les monoterpènes oxygénés sont le principal composé de *T. polium* [7].

En 2022 : Majid Sharifi-Rad et al, ont publié un article dans l'objectif d'étudier les changements dans la teneur en composés phytochimiques et les activités antioxydantes, antibactériennes et anti-inflammatoires in vitro des parties aériennes de *Teucrium polium* L. Les extraits ont été analysés par GC-MS, et leurs propriétés antioxydantes ont été testées avec le DPPH, l'oxyde nitrique (NO), les ions ferreux (Fe^{2+}) et le 2,2 ' à l'acide 3- éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS). Quarante-neuf composés ont été

identifiés. Les valeurs minimales de la concentration inhibitrice (CMI) pour les extraits variaient entre 9,4 et 300 µg/mL, tandis que les valeurs minimales de la concentration bactéricide (CMM) variaient entre 18,75 et 600 µg/mL. De plus, il était plus actif sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif [8].

En 2022 : Waad A. Al-Otaibi et al, ont visé dans leur étude à préparer et à optimiser des nanoémulsions d'huile essentielle de *Teucrium polium L.* et à étudier son effet sur la sensibilité des cellules cancéreuses du côlon présentant des différences de statut p 53 (HCT116 sauvage et HT-29 mutant) à Oxa. Selon la présente étude, le dépistage anticancéreux d'Oxa + TPO-NANO a démontré qu'il inhibait la croissance cellulaire et produisait un degré plus élevé de changements morphologiques et de mort cellulaire apoptotique dans les cellules cancéreuses de type sauvage HCT116 et de type mutant HT-29 de p53 [9].

En 2022 : Waad A. Al-Otaibi et al, ont réalisé l'extraction de l'huile essentielle des parties aériennes de *Teucrium polium L.*, et ont déterminé la composition chimique de l'extrait par analyse GC-MS. L'activité antioxydante a été mesurée avec l'essai DPPH. Des méthodes de diffusion du disque d'agar et de dilution du micro-bouillon ont été utilisées pour l'évaluation antibactérienne, tandis que le test MTT a été utilisé pour l'évaluation de la cytotoxicité. Le rendement moyen du TPO était de $0,26 \pm 0,01$ %. L'huile avait une bonne activité de piégeage des radicaux. Elle a montré une activité antibactérienne contre Gram-positif *S. aureus et SARM*. Cependant, il n'a eu aucun effet sur la croissance des souches négatives. Les résultats des effets anti-prolifératifs du TPO sur deux lignées de cellules cancéreuses du côlon humain (HT-29 et HCT116) et des cellules HepG2 du cancer hépatique, ont montré qu'il avait un effet plus cytotoxique sur les cellules HT-29 et HCT116 [10].

En 2021 : Sarra Chabane et al, ont publié un article dont l'objectif était d'évaluer la composition chimique, les propriétés antioxydantes et cicatrisantes de l'huile essentielle de *Teucrium polium*. La composition a été obtenue par une combinaison d'analyses GC-FID et GC-MS. L'activité antioxydante a été évaluée par des essais in vitro (capacité antioxydante totale, DPPH et blanchiment du β-carotène). Le potentiel de cicatrisation in vivo d'une pommade contenant 10 % d'huile essentielle de *T. polium* a été étudié. L'huile essentielle a montré une activité antioxydante modérée. Les expériences in vivo ont montré que les pommades de 10 % accélèrent le processus de cicatrisation des plaies par rapport aux témoins. [11]

En 2021 : Waad A. Al-Otaibi et al, ont visé à optimiser les conditions de production de nanoémulsion huile dans eau à base d'huile essentielle de *Teucrium polium* L. avec la méthode d'homogénéisation à haute pression en utilisant un mélange de tensioactifs Tween 80. L'expérience a été conçue sur la base de la méthode Box-Behnken et l'effet de % Sp20, Tw80 : Sp20 et %TP-EO. Un essai de dilution de micro-bouillon a été utilisé pour déterminer l'effet antibactérien in vitro. Les résultats ont révélé que des TP-NE plus souhaitables avec des granulométries minimales ($153,75 \pm 1,34$ nm) et PDI ($0,04 \pm 0,003$) et un ZP maximum ($6,44 \pm 0,13$ mV) ont été obtenus en utilisant 0,16 %, 12 Tw80 : Sp20 et 0,5%TP-EO. De plus, le TP-NE avait un effet inhibiteur de croissance élevé sur *S. aureus* et le SARM. De plus, le TP-EO a inhibé la croissance de *P. aeruginosa*, de *S. sonnei*, d'*E. coli* et de *K. Pneumoniae*. [12]

En 2020 : Sarra Chabane et al, ont présenté une déterminer la composition polyphénolique d'un extrait méthanolique de *T. polium* et étudier ses propriétés cicatrisantes. De plus, la toxicité aiguë cutanée et orale a été évaluée. La composition de l'extrait méthanolique a été étudiée par analyse HPLC-PDA-MS. Une pommade de l'extrait méthanolique de *T. polium* a été mélangé avec du pétrole gelé (PJ) à une concentration de 5 % et 10 % pour obtenir les onguents. Les deux préparations ont montré un effet significatif sur la contraction de la plaie par rapport au groupe témoin. L'absence des signes de toxicité sur la peau des lapins ont indiqué l'innocuité de la pommade. Après administration orale chez la souris à des doses de 1000 et 2000 mg/kg de poids, aucun signe de toxicité hépatique et rénale n'a été détecté par analyse des paramètres biochimiques et par examen histologique. [13]

En 2019 : Hasan Fallah Huseini et al, ont visé à évaluer l'efficacité de l'extrait de *Teucrium polium* dans le traitement des plaies diabétiques et non diabétiques, ainsi que des plaies de brûlure. Le processus de cicatrisation des plaies a été examiné par macroscopie et numérisation aux jours 14 et 21 et jusqu'à la cicatrisation complète. Il n'y avait aucune infection dans les blessures des rats dans aucun groupe. Le processus de cicatrisation des plaies a montré que la pommade à l'extrait de *T. polium* avec une pommade à 10 % accélère le processus de cicatrisation chez les rats diabétiques [14].

Chapitre I

Teucrium Polium L

CHAPITRE I : TEUCRIEM POLIUM L

I.1. Introduction

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la médecine des médicaments très efficaces. Aujourd'hui, de nombreux travaux ont montré que les espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans les modèles pharmacologiques et d'autre part non toxiques. Une plante médicinale désigne une plante ou une partie d'une plante possédant des propriétés médicamenteuses par l'action synergique de ses composés actifs sans avoir des effets nocifs aux doses recommandées [15].

I.2. Les métabolites secondaires

Les produits naturels sont les composés chimiques ou les substances qui sont isolés d'un organisme vivant. Ils peuvent être sous forme de métabolites primaires ou secondaires. Ces derniers sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes [16]. Ils sont divisés principalement en deux catégories qui sont les substances non volatiles : alcaloïdes, anthocyanes, flavonoïdes, tannins connus pour leurs activités pharmacologiques ou leurs propriétés pigmentaires, et les substances volatiles : terpènes et composés aromatiques, qui constituent les huiles essentielles [17].

I.2.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges de substances aromatiques volatiles et odoriférantes qui sont présentes en faibles quantités dans le végétal. Très aromatiques, très volatiles. Chaque huile possède des propriétés spécifiques liées aux différents composants qu'elle contient. Leur composition chimique est d'une grande complexité, ce qui les rend inimitables. On peut les recueillir dans toutes les parties de la plante

(fleurs, fruits, graines, écorces, tiges, ou parfois dans la plante entière) [18]. Leur composition varie souvent selon les conditions climatiques et l'environnement.

I.2.1.1 Localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule. Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae ou Asteraceae). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essence sont localisées dans les tissus internes [19].

I.2.1.2 Composition chimique des huiles essentielles

Sur le plan chimique, les huiles essentielles sont des molécules très volatiles, de structures extrêmement complexes, synthétisées à partir d'unités méthyle-2-buta-1,3- diène (isoprène). Les diverses combinaisons de ces unités, par réactions d'addition, conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, diterpènes, mais aussi à leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques.

➤ Les terpénoïdes

Dans le cas des huiles essentielles, seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire, ceux dont la masse moléculaire n'est pas élevée sont observés. Ils répondent dans la plupart des cas à la formule générale $(C_5H_8)_n$. Les constituants des huiles essentielles sont très variés ; on y trouve en plus des terpènes, des hydrocarbures, des esters, des lactones, des aldéhydes, des alcools, des acides, des cétones, des phénols, des oxydes et autres.

➤ Les monoterpènes

Les carbures sont presque toujours présents. Ils peuvent être acycliques (terpinène, cimène) ou bicycliques (pinène, camphène, sabinène). Ils constituent, parfois plus de 90 % de l'huile essentielle (citrus, térébenthus).

➤ Les sesquiterpènes

Ils sont de structures très diverses (C15) : les carbures, les alcools et les cétones sont les plus fréquents.

➤ Les composés aromatiques

Les composés aromatiques sont moins fréquents dans les huiles essentielles. Très souvent, il s'agit d'allyle et de propénylphénols. Ces composés aromatiques constituent un ensemble important car ils sont généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles.

I.2.1.3 Propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles forment un groupe très homogène. Liquides à température ambiante, et volatiles, Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévie la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles. Elles sont douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques. Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux [20].

a) Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont des propriétés antiseptiques, dépuratives, cicatrisantes, analgésiques et anti-inflammatoires, des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et antihelminthiques ; et aussi des propriétés antioxydantes. Et aussi :

- Action stimulante sur l'utérus, effet abortif en cas d'intoxication ;
- Action sur le système nerveux central, en exerçant des effets sédatifs ou narcotiques, relaxants et déstressants ;
- Effet anticancéreux, en stimulant l'apoptose des cellules tumorales.

b) Toxicité des huiles essentielles

La toxicité des huiles essentielles reste moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5g/kg [21].

c) Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est considérée comme la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles. Elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative.

➤ Le couplage Chromatographie phase gazeuse / Spectrométrie de masse (CPG/SM)

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence, durant cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes.

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ.
- **Accélération** : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leur énergie cinétique.
- **Séparation** : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge.
- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées.
- **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondant à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

I.3 Présentation du taxon étudié : *Teucrium polium* L

Le genre *Teucrium*, regroupe environ 260 espèces de plantes herbacées ou de sous-arbrisseaux appartenant à l'ordre des Lamiales et à la famille des Lamiacées [22]. Cette famille est largement répartie dans le bassin méditerranéen et très important dans la flore Algérienne. Certains genres sont de détermination délicate en raison de la

variabilité extrême des espèces. C'est une espèce très variable ; de nombreuses sous espèces ont été décrites dont certaines sont parfois érigées au rang d'espèce.

Elle porte les noms communs comme mountain germander (Anglais), pouliot de montagne, germandrée tomenteuse, germandrée blanc-grisâtre (Français). En Algérie cette plante est connue par plusieurs noms vernaculaires tels que : Khayata, Katabet le djrah [23].

✓ Description botanique

Teucrium polium est une espèce polymorphe et très variable, de nombreuses sous espèces ont été décrites dont certaines sont parfois érigées au rang d'espèce [24]. C'est une plante herbacée vivace à odeur poivrée par frottement. Les tiges sont de 10- 30 cm de hauteur, blanche-tomenteuses portant des feuilles opposées sessiles, linéaires- lancéolées ou oblongues, en coin et entières à la base et à dents arrondies en haut. Ces feuilles, blanches tomenteuses sur les deux faces ont les bords enroulés. Les fleurs forment des inflorescences compactes globuleuses ou ovoïdes serrées (Figure I. 1). Le calice brièvement tomenteux, à des dents courtes, la supérieure obtuse ; Corolle à lèvre supérieure tronquée et à lobes supérieurs pubescents [25].



Figure I.1 : Photo de *Teucrium polium* L. [25]

✓ Classification botanique

Selon Autore [26], *Teucrium polium* est classée comme suit :

Règne : Plantae ;

Embranchement : Spermatophytes ;

Classe : Angiospermes ;

Sous classe : Asteridae ;

Ordre : Lamiales ;

Famille : Lamiacées ;

Genre : *Teucrium* ;

Espèce : *Teucrium polium* L ;

✓ Caractères morphologiques, distribution géographique et habitat

Cette plante est vivace herbacée, parfumée, très polymorphe et velue-laineuse, à tiges nombreuses et ramifiées. Les feuilles sont petites, opposées ou en touffes, à très courtes pétioles, entières ou faiblement crénelées sur les bords, tomenteuses enroulées et blanchâtres en dessous. Les fleurs sont blanches ou jaunâtres, en grappes denses au sommet des rameaux. Le calice est vert-grisâtre, la corolle est blanche, les inflorescences en têtes compactes. Le fruit est constitué de quatre parties brunes et orné en réseau à sa surface [27].

Les espèces du *Teucrium* dont *polium* poussent de manière sauvage dans un sol bien drainé. En Algérie, elle se localise dans la région du Tell, les Hauts plateaux, l'Atlas saharien, les montagnes du Hoggar, elle se trouve peu au Sahara septentrional et au Tassili.

✓ Composition chimique de l'espèce

Plusieurs travaux ont été menés sur les différentes classes phytochimiques de cette espèce. Subséquemment. Des études ont été faites ont montré que les huiles essentielles de la partie aérienne de *T. polium* sont caractérisées par une richesse en sesquiterpènes. [28]

Les différentes investigations chimiques ont été également exhibées que cette plante possède des phényl-propanoïdes glycosides, des flavonoïdes, des saponines glycosides à base de triterpénoïdes et stéroïdes. [29]

✓ **Activités biologiques de *Teucrium polium***

La plante *Teucrium polium* et ses différents extraits possèdent diverses activités biologiques, étudiées à l'échelle mondiale. Le bénéfice thérapeutique des plantes médicinales est souvent attribué à leurs propriétés antioxydantes. [30]

Les activités biologiques de *T. polium* ont été largement signalés et il a été démontré qu'il possède des effets hypolipémiants [31] ; antipyrétiques [32] ; surtout pour ses propriétés antilipémiqes [33]; antapoptotique [34] ; fumigante. [35]

✓ **Toxicité de plante**

La plupart des espèces de *Teucrium* sont potentiellement hépatotoxiques en raison de la présence des quantités variables de composés diterpénoïdes du type néoclerodane qui sont considérés comme les marqueurs chimiotaxonomiques de genre. Plusieurs cas d'hépatotoxicité chez l'espèce *Teucrium polium* ont été décrits. [36]

Les composés furano diterpénoïdes de la germandrée subissent une activation métabolique en métabolites électrophiles capables de se lier de manière covalente aux protéines des hépatocytes. Les isoenzymes CYP3A catalysent la formation d'époxydes réactifs et / ou d'aldéhydes insaturés à partir de ces composés aromatiques. [37]

I.4. Conclusion

Les plantes tinrent une place très importante qui ne s'est jamais démentie. *Teucrium polium* L. possède un large spectre d'effet pharmacologique. Par conséquent, d'autres investigations sont nécessaires maintenant pour élucider le mécanisme d'action pharmacologique et identifier les composants bioactifs responsables de telles actions afin d'expliquer leur efficacité thérapeutique.

Chapitre II

Les Nano-Emulsions

CHAPITRE II : LES NANOEMULSIONS

II.1. Introduction

La nanotechnologie pharmaceutique permet de fournir des dispositifs et des matériaux présentant des nouvelles propriétés physiques, chimiques et biologiques en raison de leur taille nanométrique, offrant donc l'avantage de protéger les médicaments de la dégradation ; soit de réduire le nombre de doses nécessaires et avoir un traitement efficace. [38]

II.2. Définition des nanoémulsions

Selon l'IUPAC [39], une émulsion est une dispersion de gouttelettes d'un liquide dans une phase continue d'un autre liquide, non miscibles entre eux. Les nanoémulsions (NEs) sont des systèmes « métastables », c'est-à-dire hors équilibre thermodynamique. Leur diamètre est de 20 nm à 200 nm. [40]

En effet, leur petite taille leur permet d'avoir des propriétés nettement avantageuses, en voici quelques exemples :

- ✓ Une surface élevée par unité de volume.
- ✓ Une meilleure stabilité face aux phénomènes de gravité en raison de la petite taille des gouttelettes.
- ✓ De bonnes propriétés d'apparence, de texture et de rhéologie.
- ✓ De bonnes propriétés de transport d'actifs grâce à une meilleure pénétration cutanée.

II.3. Les différents types de nanoémulsions

Il existe plusieurs types de nanoémulsions .Ces derniers vont être exposées dans la figure suivante.



Figure II.1 : Les différents types de structures de nanoémulsions. [40]

II.4. Propriétés physico-chimiques des nanoémulsions

Les nanoémulsions sont de plus en plus utilisés dans de nombreux domaines grâce à leurs propriétés physico-chimiques très intéressantes.

✚ **Apparence** : Les gouttelettes étant petites, les ondes lumineuses sont de dispersion très faible. Cela permet la création de produits transparents.

✚ **Texture** : Le faible diamètre des gouttelettes influence également les propriétés rhéologiques, où elles vont avoir une très faible viscosité, semblable à l'eau. Les produits auront donc un aspect fluide.

✚ **Stabilité** : Ces produits ont une longue stabilité grâce à la faible taille des gouttelettes. Le principal mécanisme d'instabilité que peuvent subir les NEs est le mûrissement d'Ostwald.

II.5. Formulation des nanoémulsions

Les NEs peuvent être préparées par différentes méthodes classées dans deux grandes catégories : les méthodes à haute énergie et les méthodes à basse énergie.

II.5.1 Méthode d'émulsification à haute énergie

Dans ces procédés, les nanoémulsions sont émulsifiées grâce à des appareils mécaniques qui permettent la formation de très fines gouttes.

✚ Homogénéisation à haute pression (HPH)

Dans ce procédé, il faut commencer par réaliser une pré-émulsion grossière. Cette pré-émulsion est ensuite introduite dans l'homogénéisateur. La HPH présente des avantages

comme une production élevée, adaptée pour une production continue, elle est plus rentable et efficace à grande échelle [41]. La figure ci-dessous illustre le principe :

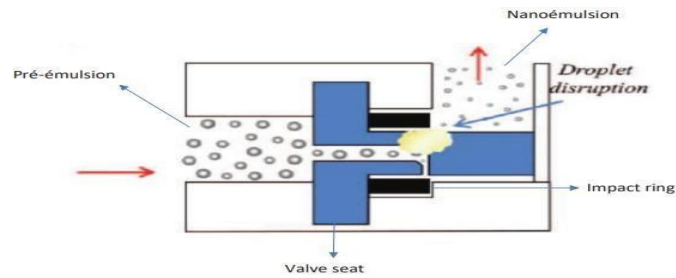


Figure II.2 : Schéma du fonctionnement d'un homogénéisateur à haute pression. [41]

✚ Emulsification assistée par ultrasons

L'émulsification assistée par ultrasons a attiré une attention considérable pour la fabrication des nanoémulsions en raison de sa capacité à produire de petites gouttelettes avec un bon rendement énergétique et un coût relativement faible. [42]

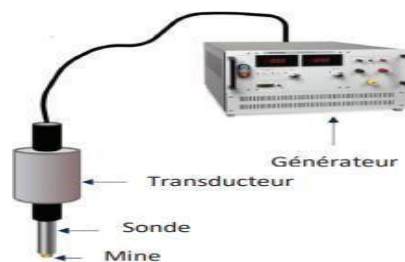


Figure II.3 : sonde à ultrasons. [42]

✚ Microfluidisation

Dans cette technologie, il s'agit d'une pompe forçant une pré-émulsion grossière dans un canal d'écoulement étroit, (Figure II.4) Cette conception entraîne la formation de très fines gouttelettes. [43]

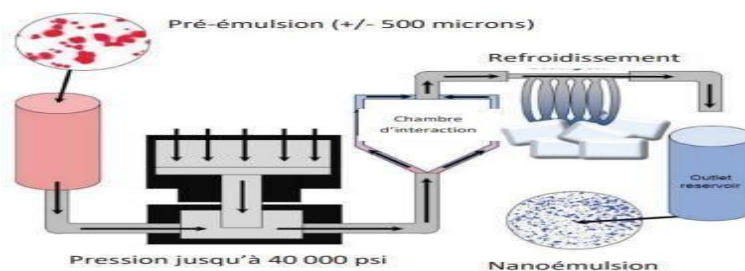


Figure II.4 : Représentation du principe de la microfluidisation. [43]

✚ Emulsification par membrane

Ce procédé est également appelé ultrafiltration. Il a pour principe de forcer les gouttelettes à traverser les pores d'une membrane très fine et dont la taille a été prédéfinie. [44]

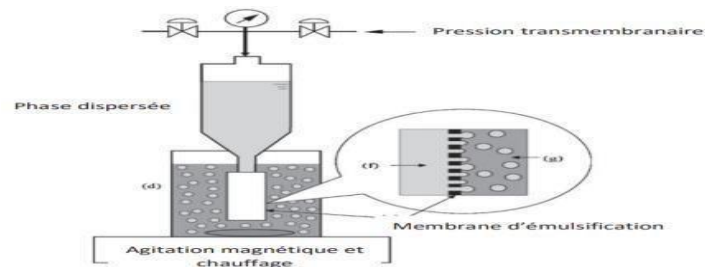


Figure II.5 : Représentation du procédé de l'émulsification par membrane. [44]

II.5.2 Méthodes d'émulsification à faible intensité d'énergie

Les procédés à faible utilisation d'énergie s'appuient sur le contrôle des phénomènes se produisant à l'interface. [45]

✚ Emulsification Spontanée

Les NEs sont générées par un simple mélange de deux phases liquides à température constante, ce qui va alors provoquer une forte perturbation à l'interface des deux phases ainsi qu'une augmentation de l'aire interfaciale. [46]

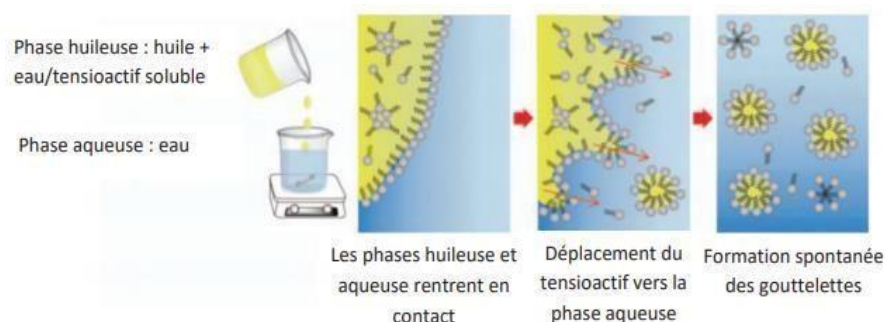


Figure II.6 : Illustration du phénomène d'émulsification spontanée. [46]

✚ Température d'inversion de phases (PIT)

La préparation des NEs peut être divisée en 3 étapes principales :

- Formation d'une émulsion grossière.
- Le mélange est chauffé progressivement jusqu'au point PIT au minimum.
- Enfin, la solution est rapidement refroidie à température ambiante sous agitation, provoquant la formation de nanoémulsions H/E.

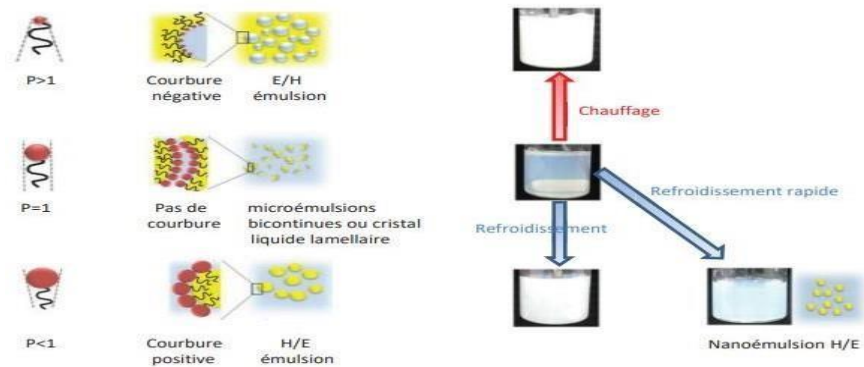


Figure II.7 : Illustration de la formation de nanoémulsions par la méthode PIT.

✚ Inversion de phases par la composition (PIC)

La préparation des nanoémulsions par la méthode PIC peut être divisée en 3 étapes : mélange de la phase organique (huile + tensioactif), titrage de la phase aqueuse dans une phase organique et mélange supplémentaire. [47]

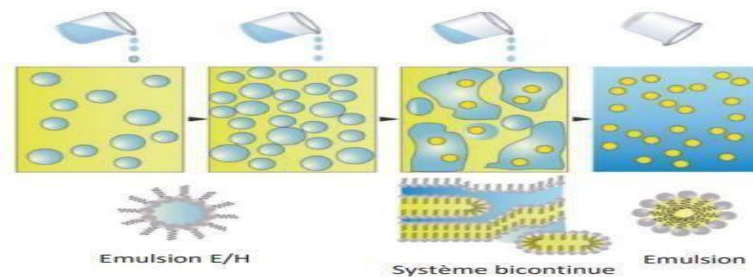


Figure II.8 : Illustration de la méthode PIC. [47]

II.6. Mécanismes de déstabilisation

Les nanoémulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables à cause des interactions moléculaires défavorables qui se produisent à l'interface huile-eau en raison de l'effet hydrophobe. Plusieurs mécanismes peuvent se produire simultanément et la présence de l'un d'entre eux peut favoriser la survenue d'un autre. [48]

II.6.1. Murissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald est un processus par lequel les gouttelettes les plus petites rétrécissent alors que les plus grandes gouttelettes se développent.



Figure II.9 : Mûrissement d'Ostwald. [48]

II.6.2. Agrégation des gouttelettes

Il existe deux types d'agrégations : la coalescence et la floculation. Dans une NEs, à cause du déplacement des gouttelettes lié aux mouvements Brownien, à la gravité ou à l'agitation mécanique. [49]

+ Floculation

La floculation est le processus par lequel deux ou plusieurs gouttelettes d'une émulsion s'agglomèrent en raison des forces d'attraction qui agissent entre elles.

+ Coalescence

La coalescence est le phénomène par lequel des gouttelettes entrent en collision et fusionnent entre elles conduisant à la formation d'une plus grosse gouttelette.

II.6.3. Séparation gravitationnelle

Ce phénomène se produit dès lors que la densité des gouttelettes est inférieure ou supérieure à celle du liquide environnant. Si les gouttelettes ont une densité plus faible, ces dernières auront tendance à remonter, c'est le crémage. Si elles ont une densité supérieure, elles auront tendance à descendre.

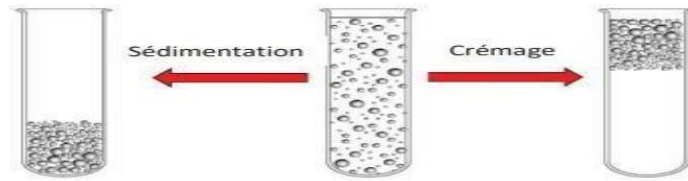


Figure II.10 : Illustration des phénomènes de séparation gravitationnelle. [49]

II.7. Contrôle de la stabilité

Les NEs peuvent être déstabilisées et perdre alors leurs propriétés. En effet, il est possible de ralentir ou d'inhiber ces phénomènes suite à plusieurs phénomènes de déstabilisation : électrostatique ; stérique ; rhéologique et électro-stérique.

✚ Stabilisation électrostatique

Cette méthode est utilisée dans les cas des phénomènes d'agrégation de gouttelettes. Elle a pour but d'envelopper les gouttelettes d'une double couche ionique et s'appuie sur la répulsion des charges de même signe.

✚ Stabilisation stérique

Cette technique est utilisée pour prévenir les phénomènes de floculation [50]. Lors de l'utilisation de ce procédé, l'opérateur va ajouter des polymères dans le système, qui vont venir s'adsorber à l'interface des gouttelettes. Celles-ci vont alors créer une barrière physique permettant d'augmenter la distance entre les gouttes.

✚ Stabilisation rhéologique

La stabilisation rhéologique consiste à ajouter des agents permettant d'augmenter la viscosité de la phase continue rendant alors les gouttelettes moins mobiles et la probabilité de choc plus faible. [51]

✚ Stabilisation électro-stérique

Cette méthode est la combinaison des deux mécanismes de stabilisation, électrostatique et stérique. Pour réaliser une stabilisation électro-stérique, il est nécessaire d'utiliser des stabilisants macromoléculaires ioniques tels que les protéines.

II.7. Les techniques de caractérisation des nanoémulsions pharmaceutiques

Les nanosystèmes pharmaceutiques doivent être étudiés selon une approche multidisciplinaire comprenant différentes étapes.

II.7.1. Analyse granulométrique

La taille et la distribution de taille des gouttelettes d'une NE sont des paramètres importants parce qu'elles influencent la stabilité [52]. La mesure de taille submicronique nécessite l'utilisation de techniques adaptées à la taille nanométrique telles que la diffusion dynamique de la lumière et la microscopie électronique.

✚ Diffusion dynamique de la lumière

La DLS est une technique non invasive bien établie pour mesurer la distribution en taille des nanoparticules. Elle s'appuie sur l'effet de décalage, lorsque la lumière monochromatique (laser) frappe des particules en mouvement Brownien dans une suspension colloïdale. [53]

✚ Charge de surfaces des gouttelettes

La méthode de mesure du potentiel Zêta (ζ) est basée sur la mesure de la mobilité électrophorétique (UE) des particules. Dans cette méthode, l'échantillon est soumis à un champ électrique, les gouttelettes vont alors se déplacer avec une vitesse qui dépend du champ électrique appliqué, du constant diélectrique (ϵ_r), de la viscosité de la phase continue (Pa.s). [54]

✚ Microscopie électronique

Les microscopes optiques ne permettent pas de visualiser les gouttelettes de moins de 500 nm. Seuls les microscopes électroniques peuvent être utilisés pour cela. Ces méthodes microscopiques donnent des informations sur la taille des gouttelettes et aussi sur leur morphologie et leur structure. L'analyse des NEs par ces méthodes est faisable sans préparation préalable de l'échantillon. [55]

II.7.2. Comportement rhéologique

Les NEs présentent des propriétés rhéologiques différentes en raison de la très petite taille des gouttelettes [56]. Cependant, l'étude plus approfondie du comportement rhéologique nécessite des rhéomètres. Cela permet de réaliser la courbe d'écoulement d'une émulsion.

II.7.3. Cinétique de diffusion Ex-vivo

La libération du médicament est souvent évaluée avec des cellules de diffusion. La figure

II. 11 montre un schéma de la cellule de Franz consistant en une chambre de récepteur de 10 ml de volume et une chambre de donneur qui sont séparées par une membrane ressemblant à la peau. En tant que modèle représentatif, la chambre du récepteur est remplie d'une solution tampon 0,1M à pH 4,7 et la température du dispositif est maintenue à $37 \pm 0,5$ °C. L'échantillon est distribué de manière homogène sur la membrane. Le processus de libération débute par l'addition d'un volume donné de solution tampon à la chambre du donneur. Par la suite, des prélèvements sont retirés à des moments présélectionnés pour suivre le processus. Ces solutions sont analysées par spectroscopie ou par chromatographie pour quantifier le contenu en médicament [57]. La figure ci-dessous illustre le dispositif

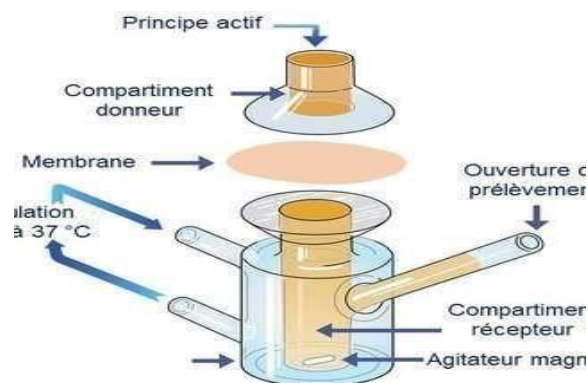


Figure II.11 : Schéma d'une cellule de Franz. [57]

II.8. Conclusion

Les technologies nanométriques suscitent de plus en plus d'intérêt dans les domaines de la recherche et de l'industrie pharmaceutique. Une large gamme de formes pharmaceutiques basant sur la nanotechnologie est en cours de développement en tant que systèmes d'encapsulation et de délivrance des substances actifs.

Chapitre III

Patchs Transdermiques

CHAPITRE III : PATCHS TRANSDERMIQUES

III.1. Introduction

Avec l'avènement des nanotechnologies, l'administration transdermique des médicaments est devenue de plus en plus une voie d'administration plus avantageuse par rapport aux autres voies traditionnelles [58]. La diffusion des médicaments à travers la peau est un concept prometteur depuis longtemps, vu la rapidité d'accès, la grande surface de la peau et la grande exposition aux réseaux circulatoires et lymphatiques, ainsi que son parcours non invasif. [59]

III.2. Définition

Les patchs ou timbres transdermiques, sont des dispositifs qui permettent d'administrer une dose de médicaments, pour un effet local ou systémique, à travers la peau. Leur développement a vu le jour au début des années 70 et le premier patch, approuvé par le FDA « Food And Drug Administration » en 1979, traitait le mal du transport. [60]

Afin d'obtenir un débit contrôlé pendant une période donnée, des membranes spéciales sont incorporées. Il existe deux types de patchs :

1. Les systèmes à réservoir, composés d'une couche de support, un revêtement pour une protection externe imperméable à la substance active, d'une couche de protection à enlever avant l'application du patch, d'un compartiment réservoir contenant le médicament et d'une membrane perméable qui régule la diffusion à travers la peau.
2. Les systèmes dits matriciels qui comprennent des couches supérieures et inférieures identiques à celles du premier type, ainsi que des médicaments dissous et dispersés dans un polymère. La diffusion dans ce type de patchs est contrôlée essentiellement par les propriétés physico-chimiques des médicaments.

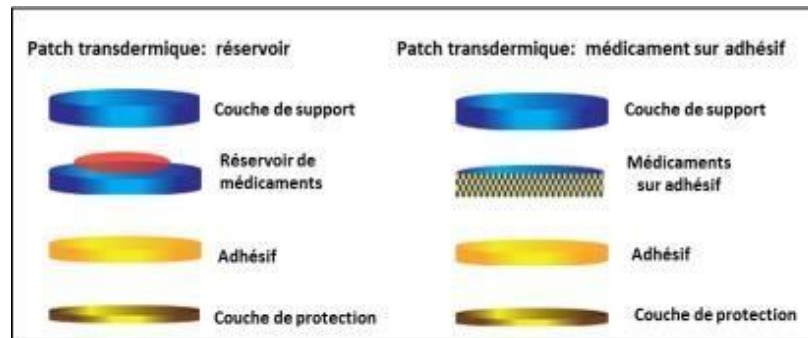


Figure III.1 : types de patchs transdermiques. [60]

III.3. Délivrance transdermique des médicaments

La délivrance transdermique est une méthode indolore d'administration des médicaments par voie systémique, consistant à appliquer une formulation médicamenteuse sur une peau saine et intacte. Le médicament pénètre initialement dans la couche cornée, puis passe à travers l'épiderme et le derme plus profond sans accumulation de médicament dans la couche dermique. [61]

III.3.1 La diffusion transdermique

La diffusion est un processus cinétique passif qui détermine le mouvement de molécules sous l'effet d'un gradient de concentration, d'une région de concentration élevée vers une région moins concentrée. La diffusion du médicament se fait alors de la surface de la peau vers les couches profondes jusqu'à ce que les concentrations soient à l'équilibre.

Le processus de diffusion est influencé par plusieurs facteurs qui peuvent être groupés en deux parties : des facteurs qui influencent l'efficacité de la barrière cutanée et des facteurs qui jouent sur le comportement des molécules vis-à-vis de cette barrière.

La première catégorie est liée au patient ; l'épaisseur de la couche cornée et le nombre de follicules, la variabilité intra et interindividuelle est un paramètre important à maîtriser, il peut changer selon la couleur de peau, l'âge du patient.

La deuxième catégorie est liée au principe actif; ce sont les propriétés physicochimiques et biologiques des molécules qui déterminent le taux de la diffusion et même la stabilité d'un produit médicamenteux. [62]

Hormis ces facteurs qui pénalisent la diffusion, cette dernière présente d'autres limitations comme le nombre très réduit de candidats potentiels, la faible quantité diffusée du principe actif, ce qui amène à augmenter la taille du patch et prolonger son activation, et puis le manque de maîtrise et de contrôle de la dose administrée.

Du fait de ces restrictions conséquentes, des méthodes sont en cours de recherche pour promouvoir la diffusion et atteindre une efficacité thérapeutique significative. Ces techniques peuvent être physiques comme l'électroporation, les microaiguilles, la sonophorèse et l'ionophorèse. Ou chimiques se basant sur des techniques liées à la perturbation d'une façon réversible de la couche cornée en la rendant plus perméable à une large gamme de molécules. [63]

Pour résumer, chacune des techniques citées précédemment offre des avantages et des inconvénients qui sont présentés dans le Tableau III.1.

Tableau III.1 : Avantages et inconvénients des techniques de promotion de diffusion.

Technologies	Avantages	Limitations
Electroporation	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle la profondeur de penetration. • Délivre des molécules polaires et/ou avec large masse molaire. 	<ul style="list-style-type: none"> • Peut s'avérer dangereuse. • Moins efficace.
Micro-aiguilles	<ul style="list-style-type: none"> • Technologie mature. • Dispositif miniature. • Aucune douleur. 	<ul style="list-style-type: none"> • Micro-fabrication parfois complexe. • Coûteux.
Sonophorèse	<ul style="list-style-type: none"> • Délivrance contrôlée. • Effet prolongé comparé à l'électroporation. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limité aux petites molécules • Miniaturisation très compliquée. • Irritations et brûlures mineures.
Ionophorèse	<ul style="list-style-type: none"> • Délivrance programmable et contrôlée. • Dispositif miniature et réutilisable. • Effet thérapeutique rapide Local ou systémique Technologie mature. 	<ul style="list-style-type: none"> • Favorise majoritairement les molécules chargées.

III.4. Structure de la peau

La peau est l'organe le plus large du corps humain, avec en moyenne près de 2 m² de surface. A la fois souple et résistante aux attaques constantes des agents du milieu externe, que ce soient des radiations UV, des allergènes ou des microorganismes. Elle permet la régulation de la température et de la pression artérielle, en plus d'assurer la fonction sensorielle grâce aux terminaisons nerveuses. La peau est composée de trois couches comme présenté sur la Figure III.2.

- ✓ **L'épiderme** : il comporte une région importante, appelée la couche cornée « Stratum Corneum » ; il s'agit de la couche extérieure de l'épiderme avec une épaisseur approximative de 10 à 25 µm. Elle se compose de 15 à 25 couches de cellules hexagonales, aplaties et empilées noyées dans une matrice de lipides intercellulaires. Ces cellules sont riches en kératine. [64]
- ✓ **Le derme** : d'une épaisseur d'environ 1,1 mm, le derme est la couche médiane, il est constitué de fibroblastes et de fibres de collagène et d'élastine noyées dans un gel visqueux. Il contient un vaste réseau vasculaire qui garantit à la peau une nutrition, une réparation et un échange thermique.
- ✓ **L'hypoderme** : appelé aussi tissu sous cutané, c'est la couche la plus profonde de la peau avec une épaisseur d'environ 1,2 mm, un tissu plutôt élastique qui a un rôle d'isolant thermique et d'absorbeur de vibrations. Une sorte de coussin de protection qui sépare la peau des systèmes nerveux et vasculaires.

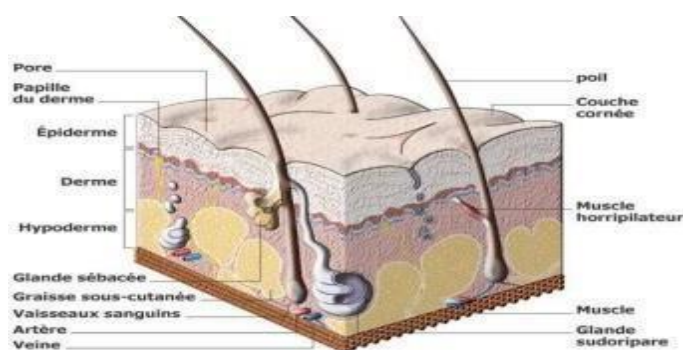


Figure III.2 : Structure de la peau humaine. [64]

Les molécules au contact de la surface de la peau se voient confronter à l'obstacle de la couche cornée. L'analyse approfondie de cette couche montre qu'elle est partiellement hydratée et 20 % de lipides, ceci explique la possibilité du passage et de la diffusion de substances liposolubles et hydrosoluble.

Il existe deux chemins potentiels pour atteindre le derme : la voie intercellulaire et transcellulaire, comme présenté sur la Figure 3.

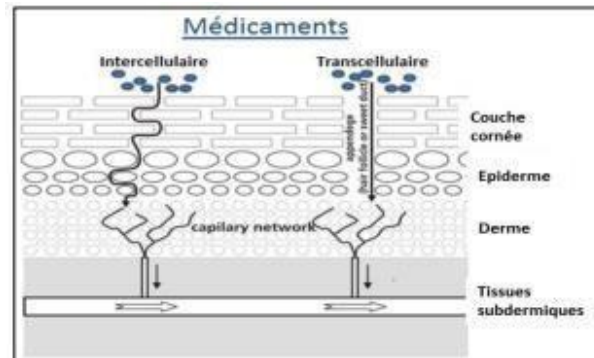


Figure III.3 : Route de pénétration des molécules à travers la peau. [64]

Par la voie intercellulaire, les molécules passent à travers les espaces entre les cellules. Même si le chemin est plus long, cette voie est la plus rapide. La composition de bicouches lipidiques favorise les molécules lipophiles et hydrophiles. La voie transcellulaire est la voie la plus directe, donc la plus courte mais aussi la plus résistante au passage des molécules. Ces dernières passent latéralement à travers les cellules de la couche cornée. Cette voie comporte aussi les conduits naturels comme les pores et les poils qui favorisent le passage des substances.

III.5. Intérêt de la voie transdermique

L'administration des médicaments par voie transdermique présente de nombreux avantages [65] :

- La libération du principe actif est très souvent prolongée par rapport à une administration orale, ce qui permet de diminuer la fréquence de doses et donc favorise l'observance.
- D'un point de vue pharmaceutique, cette forme permet une libération continue et prolongée de principe actif dans la circulation générale.
- Il n'y a pas d'effet de premier passage hépatique, ce qui permet de diminuer les doses administrées et les effets secondaires.
- L'effet pharmaceutique peut être facilement stoppé par retrait du dispositif.

III.6. Conclusion

Les dispositifs transdermiques sont des systèmes thérapeutiques qui permettent une administration systémique, contrôlée et prolongée, de principes actifs mal absorbés par d'autres voies ou subissant un effet de premier passage hépatique trop important.

Chapitre IV

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE IV : MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV .1. Introduction

Le travail réalisé dans cette présente étude a débuté par l'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne du *Teucrium polium* par Clevenger. Les tests biologiques ont été réalisés par évaluation des activités antioxydante par le protocole au DPPH et antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé d'HE obtenu. L'HE a été incorporé dans des nanoémulsions et caractérisés afin de les concevoir en patch transdermique. L'activité cicatrisante in-vivo a été faite sur des rats Wistar. Ce chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation des différentes parties de cette étude.

IV.2. Matériel biologique

Les parties aériennes (tiges, feuilles et fleurs) de *T.polium* au stade de la floraison ont été récoltées dans la région de Dirrah (Bouira).

Le matériel végétal fraîchement collecté a été séché sur du papier à l'ombre, à température ambiante et dans un endroit sec à l'abri de l'humidité et de la lumière pendant 15 jours jusqu'au moment de l'extraction des huiles essentielles. [11]

IV.2.1. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites par le procédé d'hydrodistillation. 100 g de la partie aérienne de *Teucrium polium* ont été introduits dans un appareil de type Clevenger avec 1L d'eau distillée et laissés pendant trois heures afin de récupérer les huiles essentielles. Ces dernières ont été recueillies et stockées à une température comprise entre 4-6 °C pour une analyse ultérieure. [11]

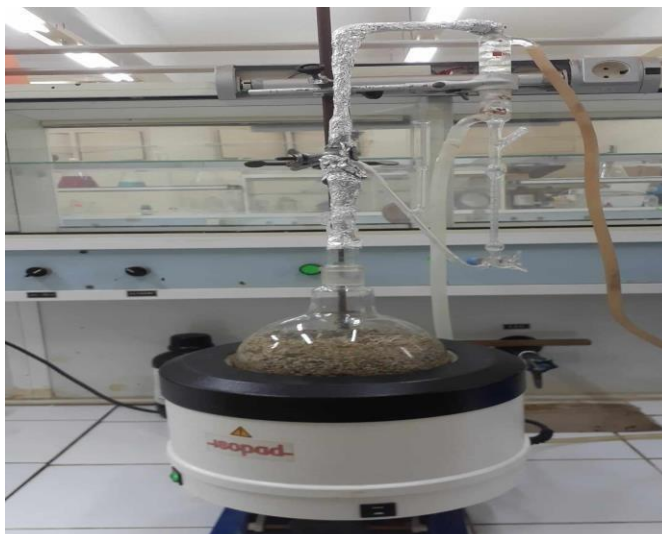


Figure IV.1 : photo du montage expérimental d'extraction de l'huile essentielle.

IV.2.2. Calcul du rendement de l'extraction

Le rendement en huile essentielle est calculé par le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante utilisée. Exprimé en pourcentage, le rendement est calculé par la formule suivante [11] :

$$R\% = \frac{PES}{PE} * 100$$

R : Rendement en pourcentage.

PES : Poids de l'huile essentielle en g.

PE : Poids de l'échantillon en g.

IV.2.3. Analyse de l'huile essentielle

L'huile essentielle récupérée a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CGMS) moyennant un chromatographe de marque Shimadzu, modèle 17-A.

- **Conditions analytiques : Les conditions chromatographiques pour réaliser l'analyse sont citées ci-dessous :**

Colonne capillaire RTx-5Ms (15 mm x 0,25 mm x 0,25 μ m, hélium comme gaz porteur (1 mL/min). Injection en mode fractionné (1:200), volume injecté 1 μ L (4 % d'huile essentielle/ Acétate v/v), température de l'injecteur 250°C. Vitesse linéaire dans la colonne 19 cm/sec. La température du four a été maintenue à 70 °C pendant 5 minutes puis à 250 °C pendant 10 minutes. La chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) a été réalisée en mode rapide, avec la même colonne et les mêmes conditions opératoires utilisées pour l'analyse GC, logiciel d'exploitation GC-MS solution version 1.02 (Shimadzu). Les données des spectres de masse ont été acquises en mode d'acquisition dans la plage m/z 40. [14]

- **Identification des composés des huiles essentielles**

Les composants huileux ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention déterminés en référence. La confirmation de l'identification des constituants des huiles essentielles a été faite par comparaison de leurs données spectrales de masse avec les spectres de référence données dans la littérature. [14]

IV.2.4 Evaluation des activités biologiques :

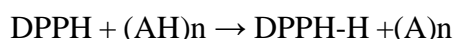
IV.2.4.1. Activité antioxydante

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de la plante étudiée, des tests ont été réalisés à savoir le pouvoir de piégeage des radicaux DPPH.

- **Pouvoir du piégeage du radical DPPH'**

Le DPPH' (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre stable, dû à la délocalisation de l'électron de réserve sur la molécule entière. Ainsi, DPPH' ne se dimérise pas, comme c'est le cas avec la plupart des radicaux libres. La délocalisation sur la molécule DPPH' détermine l'apparition d'une couleur pourpre, avec une bande d'absorption avec un maximum d'environ 517 nm. Lorsque DPPH' réagit avec un donneur d'hydrogène, la forme réduite (DPPH) est générée, accompagnée de la disparition de la couleur violette. Par conséquent, la diminution de l'absorbance

dépend linéairement de la concentration en antioxydant. On peut résumer la réaction de la manière suivante :



Où (RH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picrylhydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. [66]

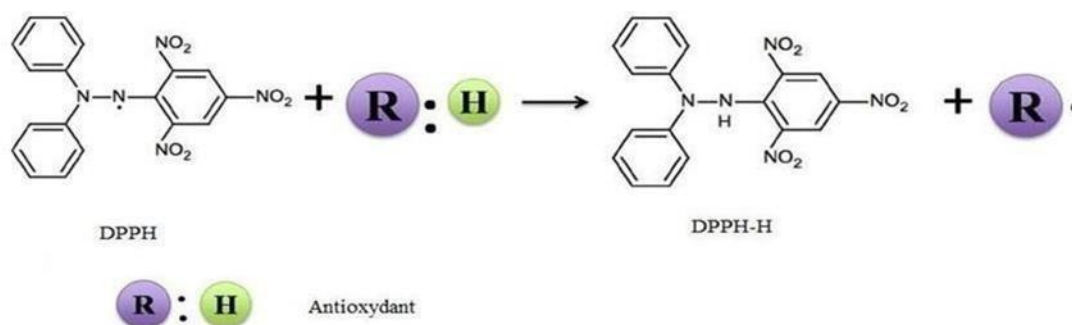


Figure IV.2 : Réaction entre le radical DPPH[•] et l'antioxydant pour former DPPH stable. [66]

▪ Mode opératoire

Une solution de DPPH de 0.04 mg/mL est fraîchement préparée dans le méthanol. À partir d'HE conservée, une solution méthanolique de 50 µg/mL est préparée ; elle est dite solution mère. Différentes dilutions sont préparées pour obtenir des solutions filles. Le test s'effectue en mélangeant 1,5 mL de différentes concentrations de l'huile essentielle (1,5; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 µg/mL) avec le même volume d'une solution méthanolique du DPPH ensuite complète avec le méthanol jusqu'à 10 mL.

Le contrôle négatif (témoin) est préparé en mélangeant 1,5 mL de méthanol avec 1,5 mL de la solution de DPPH. Après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est déterminée à $\lambda = 517$ nm.

Le contrôle positif (référence) est présenté par la solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque témoin.

Le pourcentage d'inhibition est calculé par l'équation :

$$\% \text{ inhibition} = 100 * (A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{blanc}}$$

La concentration d'antioxydants requise pour diminuer la concentration du DPPH[•] initiale de 50 % est notée IC_{50} exprimée en $\mu\text{g/mL}$ et calculée graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés : pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations.

IV.2.5. Activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne, la diffusion sur disques a été utilisée (analyse qualitative).

▪ Souches étudiées

Les souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne sont des bactéries pathogènes (tableau 1). Les souches pures sont conservées à 4°C dans la gélose nutritive inclinée.

Tableau IV.1 : Liste des souches testées.

Nom de la souche	N°ATCC	Gram	Famille
<i>Bacillus Subtilis</i>	6633	+	<i>Bacillaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	<i>Micrococcaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Escherichia coli</i>	8739	-	<i>Enterobacteriaceae</i>

▪ Technique de l'aromatogramme

La méthode des aromatoigrammes consiste à déposer un disque stérile en cellulose de 6 mm de diamètre imprégné de la solution d'huile essentielle, sur la surface d'une gélose préalablement coulée dans une boîte de Pétri etensemencée avec le micro-organisme à tester. Après incubation, la lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone claire indemne de colonies autour du disque absorbant,

appelée : **zone d'inhibition**. L'apparition et l'importance du diamètre de la zone d'inhibition reflète l'impact des HEs sur les souches bactériennes. Ainsi, ces dernières seront qualifiées de sensibles ou très sensibles, ou résistantes. [67]

A partir d'une culture pure des bactéries sur milieu d'isolement (milieu gélose nutritive) et au maximum 24 heures, on racle à l'aide d'une pipette pasteur scellée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans 10mL d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne ; lue à la longueur d'onde de 625 nm qui correspond à 10^8 UFC.

La solubilisation de l'huile essentielle est faite dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pur. Pour la préparation des différentes concentrations d'huile, 100 μ L de l'HE est introduite dans un tube à essai stérile auquel 200 μ L de DMSO pur sont additionnés.

Les tubes sont énergétiquement agités au vortex jusqu'à homogénéisation totale de la solution préparée, la solution résultante est notée solution 1/2. De cette dernière sont prélevés 100 μ L et sont dilués dans 100 μ L de DMSO ; solution notée 1/4.

Similairement, une solution notée 1/8 est préparée. Les trois concentrations seront utilisées dans les tests microbiologiques. Le choix de l'antibiotique a été fait en fonction de leur disponibilité, de la spécificité du germe considéré : Tétracycline a été retenue.

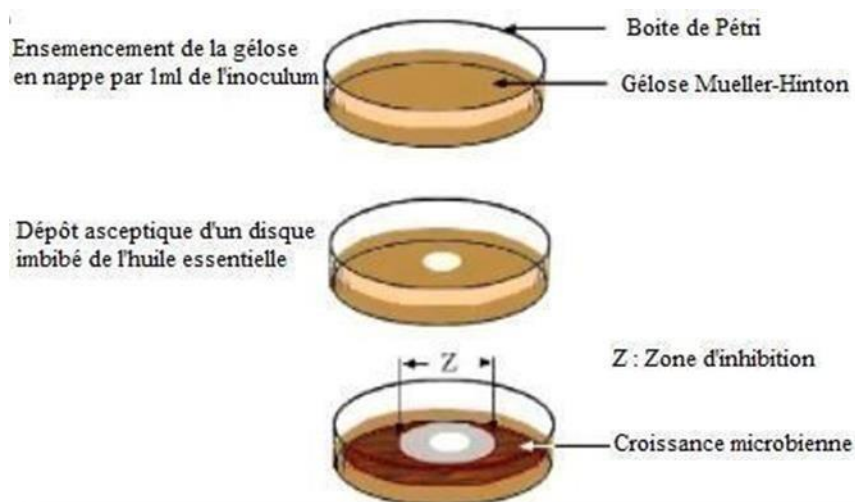


Figure IV.3 : Illustration de la méthode d'aromatogramme.

[67]

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle.

- (-) : Non sensible ou résistant ; diamètre < 08 mm.
- (+) : Sensible ; diamètre compris entre 09 et 14 mm.
- (++) : Très sensible ; diamètre compris entre 15 et 19 mm.
- (+++) : Extrêmement sensible ; diamètre > 20 mm.

▪ Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI est faite en utilisant la méthode de micro-dilution en milieu gélosé à partir d'une gamme de concentrations de l'huile essentielle. Une série de dilutions est réalisée à partir de solutions mères (100µg/mL de l'HE préparée dans 500µL/mL de DMSO pur). Ces concentrations sont de 2.5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 40 et 80 µg/mL pour l'huile essentielle.

Deux millilitres de chaque dilution sont alors incorporés à 38 mL de milieu Muller Hinton. Les mélanges sont immédiatement répartis dans deux boîtes de pétrie à raison de 20 mL par boîte. Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant l'huile ou non (témoin), est effectuée en surface sous forme de six dépôts de 1 µL de chaque souche microbienne. Après incubation à 35°C pendant six jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible comparativement au témoin. [68]

IV.3. Formulation des nano-émulsions

La nano-émulsion (TPO-NANO) a été produite avec la méthode d'homogénéisation à l'aide d'un ultra-turax, en utilisant (T80) et le (Glycérol) comme TA et co-TA. Différentes proportions d'eau distillée, de TPO et de T80 ont été mélangées dans un bécher et chauffées à 60 °C, avec un mélange constant à l'aide du mélangeur Vortex à une vitesse de 3000 tr/min pendant 10 min. Par la suite, du glycérol a été ajouté au mélange final et le mélange a été homogénéisé en continu à 7000 tr/min pendant 30 min. [10]

Tableau IV.2 : Compositions trois formulations des NEs.

Formulation	<i>Tween 80</i>	<i>HE</i>	<i>Glycérol</i>
1	6	0.72	1.02
2	7.5	0.90	1.28
3	9	1.08	1.53

IV.3.1. Caractérisation des nano-émulsions

Les nanoémulsions formulées ont été caractérisées par des méthodes physico-chimiques et particulièrement l'évaluation de la taille et du potentiel zêta qui sont les paramètres essentiels qui confirment la stabilité de l'émulsion. D'autres contrôles ont été préalablement effectués.

▪ **Contrôle organoleptique**

Tous les NEs ont fait l'objet d'une inspection visuelle de la couleur, de l'aspect et de l'homogénéité.

▪ **Diamètre moyen**

La taille moyenne des NEs obtenu a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière. Les mesures ont été effectuées avec l'appareil DLS de marque Horiba (SZ-100, USA). Les diamètres hydrodynamiques ont été calculés à partir de la fonction d'autocorrélation de l'intensité de la lumière diffusée par les particules. Tous les échantillons ont été dilués avec de l'eau distillée avant d'être placés dans la cellule en verre. Toutes les mesures ont été effectuées à 25°C.

▪ **Potentiel zêta**

Le taux de mouvement des particules sous l'influence d'un champ électrique oscillant externe a été mesuré avec un Zêta-mètre Horiba (SZ-100, USA). Le potentiel zêta a été calculé à partir de la valeur de la mobilité électrophorétique.

Tous les échantillons ont été dilués puis placés dans une cellule de type GOLD

PLATING de 6 mm, Toutes les mesures ont été effectuées à 25 °C.

▪ Analyse par microscope optique

L'analyse a été réalisée en utilisant un microscope optique de type LEICA, Allemagne. L'échantillon a directement été placé entre une lame et lamelle destinées à être examinée au microscope.

▪ Mesure du pH

Le pH a été déterminé en déposant l'électrode d'un pH-mètre dans les NEs en solution. Le pH a été mesuré 3 fois et la moyenne des valeurs de pH a été enregistrée.

▪ Caractérisation rhéologique

L'étude rhéologique de NEs réalisée à l'aide d'un rhéomètre compacte modulaire (MCR 302). La rhéologie permet donc une mesure macroscopique de la force nécessaire pour vaincre les résistances à l'écoulement, ainsi d'évaluer la stabilité et la facilité de prise au moment de l'emploi.

La détermination de la courbe d'écoulement permet de faire ressortir des paramètres caractéristiques qui sont susceptibles de refléter l'état mécanique des NEs.

La courbe d'écoulement pour est donnée en termes de contrainte de cisaillement (Pa.s) en fonction de la vitesse de cisaillement γ (s^{-1}). [69]

IV.4. Préparation des patchs

Des films ont été conçus par la technique d'évaporation du solvant. Différentes solutions de biopolymères de volume de 20 mL ont été préparées selon les compositions indiquées dans le **Tableau IV.3**. Pour ce faire, au départ, la CMC, la gélatine (Gel), le PVA ont été solubilisés séparément sous faible agitation dans de l'eau distillée à 80, 35 et 90°C respectivement. Ensuite, afin d'éliminer les bulles d'air formées lors des différentes solubilisations, les solutions ont été laissées au repos pendant toute une nuit.

Puis, au bout des 24 heures, les ingrédients cités ont été additionnés simultanément dans un ballon de 100 mL et sous agitation rigoureuse pendant 30 minutes à température ambiante. La solution ainsi obtenue a été coulée dans des boîtes de Pétri en PS.

Elles ont été laissées sécher à l'étuve à 40°C. Des films de surface homogène ont été formés.

La NEs obtenue a été incorporée dans les films séchés et enfin laissé sécher à l'air libre pendant 48 h. Des patches de surface homogène ont été isolés. [70]

Tableau IV.3. Différentes formulations des films préparés.

Code de la Formulation	CMC	Gel	PVA
F1	5%	4%	3.5%
F2	3.5%	5%	2%
F3	7%	2.5%	2.5%

IV.4.1. Caractérisations des patches

- **Apparence physique**

Tous les patches ont fait l'objet d'une inspection visuelle de la couleur, de la souplesse, de l'homogénéité et de l'aspect.

- **Mesure de l'épaisseur**

L'épaisseur du patch a été mesurée à des endroits différents du film en utilisant un pied à coulisse, et la valeur moyenne a été calculée.

- **Endurance au pliage**

L'endurance au pliage a été déterminée en pliant plusieurs fois et au même endroit le patch jusqu'à la fracture ou bien jusqu'à ce que le nombre de plis atteigne 500 fois, c'est une condition permettant d'indiquer que le film possède une bonne endurance au pliage. [71]

- **Caractérisation par spectroscopie FT-IR**

Les spectres FT-IR ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier à double faisceau de type SHIMADZU 84005.

▪ Etude de la diffusion du P.A. ex vivo

Des études de diffusion *ex vivo* ont été menées en utilisant la cellule de Franz. Le compartiment inférieur est séparé du compartiment supérieur par des membranes. Le compartiment récepteur contient 10 mL d'une solution tampon (pH = 4,7). L'ensemble du montage a été placé dans un bain-marie, sous agitation magnétique à l'aide d'un barreau aimanté à 37°C. Un échantillon (de 2 mL) a été recueilli à des intervalles de temps définis et remplacé par un volume égal de fluide récepteur.

Les NEs ont été déposés délicatement sur la face supérieure. L'étude a été réalisée pendant 4 h, pour le patch, l'étude de diffusion est réalisée pendant 6h.

Les échantillons prélevés sont analysés par spectroscopie UV-visible à 225 nm.

IV.5. Activité cicatrisante in vivo

Pour évaluer l'effet cicatrisant de l'huile essentielle de la plante *Teucrium polium L.*, un modèle de plaie d'excision a été réalisé sur 12 rats Wistar sains, issus de l'institut Pasteur d'Alger d'un poids approximatif de 200 ± 5 g.

Les animaux ont été maintenus en période d'adaptation avant l'expérimentation, ils sont installés dans des cages en plastique transparentes ayant un couvercle en acier inoxydable. La nourriture est constituée de granulés d'origine commerciale (aliments granulés pour lapins SARL la production locale OUAHFOUN). L'eau est placée dans un biberon muni d'un tube abreuvoir de longueur convenable. Les animaux ont été répartis en 4 lots égaux, les quatre lots sont traités pendant 15 jours comme suit :

- Lot TMN : sert d'un témoin non traité ;
- Lot CCT : traité avec Cicatryl-bio (médicament standard) ;
- Lot 3 : traité par la NEs une fois par jour ;
- Lot 4 : traité par le patch une fois par jour ;



Figure IV.3 : Conditionnement des rats.

Les rats sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de Kétamine ®. Une fois l'animal anesthésié, une surface au dos du rat a été rasée et complètement nettoyée et désinfectée par une solution antiseptique à base de povidone iodée (Bétadine solution ND), appliquée avec des compresses stériles ensuite un cercle de 2 cm de diamètre a été tracé sur la peau de la région dorsale de chaque animal. Puis un lambeau de peau a été excisé sur le lieu de l'excision marquée. [72]

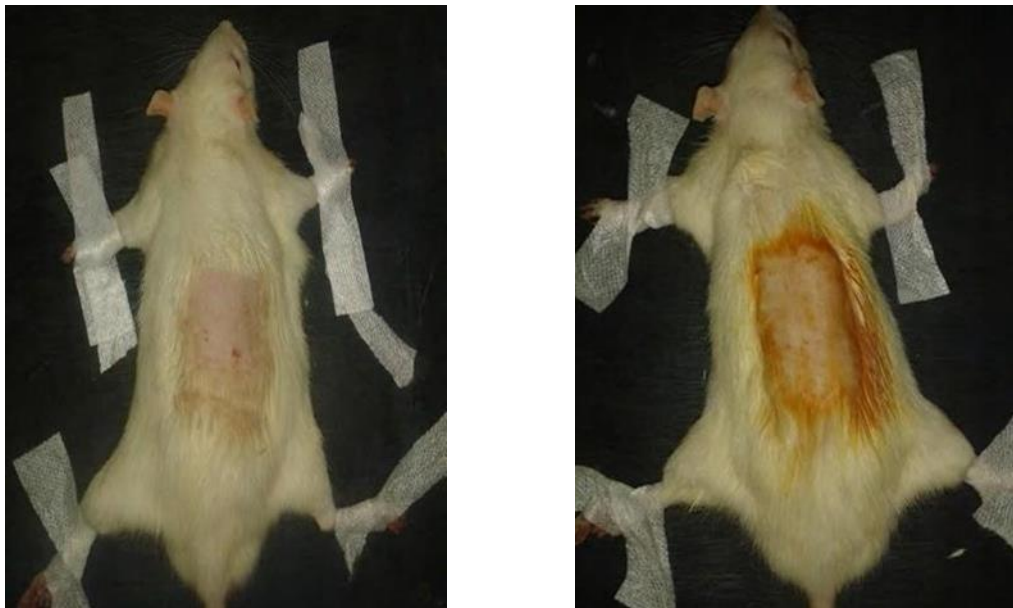


Figure IV.5 : Préparation du site opératoire.

Les rats incisés ont été placés dans des cages individuelles, les plaies ne sont pas protégées par un pansement. Les traitements ont appliqués par des applications topiques de NEs et du patch quotidiennement. L'état de la plaie a été suivi par observations

visuelles pendant 15 jours. La figure ci-dessous illustre l'état de la plaie réalisée tout au début.



Figure IV.6 : Excision d'une plaie.

IV.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le matériel et les méthodes suivies pour l'extraction et les activités biologiques de l'HE de *T.polium* ainsi la formulation de la NES et comment élaborer un patch transdermique, ainsi que l'évaluation de l'activité cicatrisante à travers la formulation réalisée. Les résultats seront présentés et interprétés dans le chapitre suivant.

Chapitre V

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSION

V.1. Introduction

Dans ce chapitre seront présentés les résultats obtenus lors des différentes étapes de la partie expérimentale avec des interprétations et discussion générale et peuvent se résumer aux points suivants :

- ✓ Calcul du rendement en huile essentielle, détermination de sa composition chimique et évaluation des activités antioxydante et antibactérienne.
- ✓ Formulation des nanoémulsions en utilisant l'HE comme phase organique et sa caractérisation physico-chimique.
- ✓ Conception d'un patch transdermique et évaluation de ses caractéristiques,
- ✓ Suivi de la libération par des tests ex-vivo et du processus de cicatrisation in-vivo.

V.2. Rendement d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle (HE) par la méthode d'hydrodistillation en utilisant des conditions opératoires strictement définis. Elle a donnée naissance à une huile essentielle de couleur jaunâtre avec une odeur très forte et persistante. Son rendement a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante ; il est de 0.66 %. Ce rendement de appartient à l'intervalle des valeurs rapportées dans la littérature allant entre 0,14 % et 0,6 %. [13]

En effet, Chabane et al [13] ont rapporté un rendement de 0,53 %, tandis que Waad et al [10] ont obtenu un rendement de 0.26 ± 0.01 % pour le *T. polium* de la région de de Riyad, cependant des valeurs supérieures ont été signalés par Sabz et al [7] (1,3 %), pour la même espèce. Ce qui montre que le paramètre **rendement** diffère d'une région à une autre. Ces variations peuvent être dues à plusieurs facteurs, notamment le degré de maturité des fleurs, l'interaction avec l'environnement (type de sol et température), le moment de la récolte et la méthode d'extraction.

V.2.1 Analyse de l'huile essentielle

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *T. polium* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Le profil chromatographique de cette huile essentielle révèle vingt-neuf (29) composés représentant un total de 98.39 % identifiés et quantifiés par GC/MS. La composition chimique de l'H Es de *T. polium* est dominée par les composés sesquiterpéniques 73.91% avec la D-Germacrène (38.36%) le composé sesquiterpénoïde le plus prédominant, la Bicyclogermacrène (13.27%), β -Germacrène (5.65%), δ -Cadinène (4.77%), α -Cadinol (2.97%), contenant ainsi 20.02% de monoterpènes, dont l' α -pinène (3.19%), la β -pinène (4.35%), Sabinene (1.92%), limonène (1.78%) sont majoritaires, , les composés ayant les plus hauts pourcentages. La classe de phenylpropane révèle un taux de 4.46% dont le carvacrol (3.58%).

Tableau V.1 : Composition chimique d'HE de *T. polium*.

Nbr de pick	t(min)	Nom de produit	Classe	Composition (%)
01	6.411	β -Pinene	Monoterpène	4.35
02	7.762	Sabinene	Monoterpène	1.92
03	7.913	α -Pinene	Monoterpène	3.19
04	8.361	β -Myrcene	Monoterpène	0.95
05	9.956	Limonene	Monoterpène	1.78
06	13.129	Linalool	Monoterpène	1.75
07	13.311	Nonanal	Monoterpène	1.88
08	15.010	(trans)-Pinocarveol	Monoterpène	0.40
09	15.297	(trans)-Verbenol	Monoterpène	0.76
10	16.138	Pinocarvone	Monoterpène	0.74
11	16.854	Terpinen-4-ol	Monoterpène	0.59
12	17.492	α -Terpineol	Monoterpène	0.96
13	17.761	Myrtenal	Monoterpène	0.75

14	19.818	Cuminaldehyde	Phenylpropane	0.42
15	22.246	Cuminalcohol	Phenylpropane	0.46
16	22.803	Carvacrol	Phenylpropane	3.58
17	26.243	Copaene	Sesquiterpène	0.88
18	26.880	Bicyclosesquiphellandrene	Sesquiterpène	0.92
19	26.967	Elemene	Sesquiterpène	0.75
20	28.208	Caryophyllene	Sesquiterpène	1.69
21	28.895	(cis)- α -Bergamotene	Sesquiterpène	1.58
22	29.710	α -Humulene	Sesquiterpène	1.32
23	30.032	Nealloocimene	Monoterpène	0.86
24	30.777	γ -Muulolene	Sesquiterpène	0.89
25	31.032	Germacrene D	Sesquiterpène	38.36
26	31.622	Bicyclogermacrene	Sesquiterpène	13.27
27	32.688	δ -Cadinene	Sesquiterpène	4.77
28	34.121	β -Germacrene	Sesquiterpène	5.65
29	37.525	α -Cadinol	Sesquiterpène	2.97
Sesquiterpène				73.91
Monoterpène				20.02
Phenylpropane				4.46

Les données chromatographiques ont montré que l'HE de *T. polium* est principalement constituée d'hydrocarbures sesquiterpéniques et caractérisée par le germacrène D (38.36%) comme composant majoritaire, suivi par et le bicyclogermacrène (13.27%), β -Germacrene (5.65%). Ce profil est plus ou moins similaire à celui rapporté par Waad [10], mais très différent de celui de la Corse rapporté par Chabane [11] qui a trouvé une composition dominée par les hydrocarbures monoterpéniques à forte teneur en β -pinène (33 %).

Généralement, les HEs des espèces *Teucrium* sont principalement constituées d'hydrocarbures sesquiterpéniques et / ou de sesquiterpènes oxygénés. Dans ce sens, Sadeghi [69] ont étudié la variabilité dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. de

différentes populations et a rapporté que le rapport sesquiterpène / monoterpène des plantes récoltées à la haute altitude était plus élevé que celui recueilli à la basse altitude. Il semble que l'augmentation de la latitude a tendance à produire plus de sesquiterpènes et moins de monoterpènes.

V.3. Etude des paramètres biologiques

V.3.1 Evaluation du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH

Les tests antioxydants *in vitro* sont conçus pour imiter les réactions d'oxydation-réduction survenant couramment dans les systèmes biologiques vivants et sont utilisés pour estimer le potentiel antioxydant de divers échantillons chimiques et biologiques.

L'activité antioxydante se mesure par la capacité de réduire les radicaux libres. Le DPPH, radical libre de couleur violet sombre devient jaune pâle lorsqu'il se trouve piégé par des substances antioxydantes. L'intensité de cette décoloration dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire et comparées à l'activité d'un antioxydant bien connu que soit l'acide ascorbique. De plus, les valeurs d'IC 50, qui font référence à la plus petite concentration d'antioxydant pour 50% de réactivité, a été calculée.

Tableau V.2 : la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

C (µg/mL)	10	11	12	13	14
PI (%)	32	49	57	61	94

Tableau V.3 : la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'HE.

C (µg/mL)	1.5	2.5	5	10	20
PI (%)	10	20	40	65	77

Les résultats obtenus du test de mesure de l'absorbance du radical libre DPPH (**Tableau V.1 et V.2**) nous a permis de tracer le graphe de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration (**Figure V.1**).

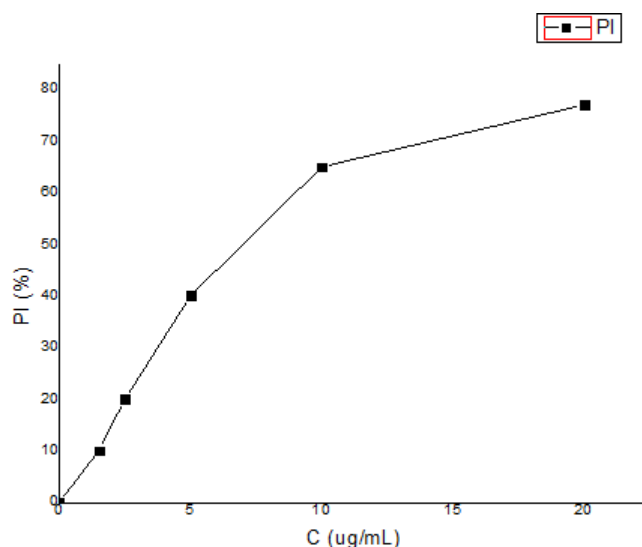


Figure V.1 : Courbe représentant la variation de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'HE.

A la lumière de ces résultats, les valeurs des IC_{50} obtenues présentant le pouvoir réducteur de l'HE de *T. polium* par rapport à celui de l'acide ascorbique prise comme un standard naturel. Il apparaît que cette activité reste est très importante comparativement à celle de l'acide. La concentration requise pour réduire 50 % de DPPH est de l'ordre de 10,314 µg/mL, relativement presque à celle de l'acide estimée à 10,211 µg/mL.

Des études antérieures ont révélé différentes activités de piégeage des TPO par le DPPH, avec des valeurs d' IC_{50} allant de 9200 à $10,14 \pm 0,15$ µg/mL. Les différences dans la composition chimique des TPO obtenues à partir des parties aériennes de *T. polium*, entre cette étude et celles rapportées dans les travaux précédents, pourraient être attribuées aux variations des conditions climatiques et des facteurs environnementaux, les emplacements géographiques et les différences génétiques. Les écarts pourraient également être dus à des différences dans les méthodes utilisées pour l'extraction de l'huile. Ces facteurs influencent grandement les propriétés antioxydantes du TPO. En outre, la capacité de piégeage des radicaux libres des TPO peut probablement être liée aux variations qualitatives et quantitatives des sesquiterpènes et des monoterpènes qui ont été signalées pour améliorer le réseau antioxydant et l'équilibre redox en antagonisant le stress oxydatif. [70]

V.3.2 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été évaluée *in vitro* en testant 4 souches de bactéries, en mesurant les zones d'inhibition (mm) et en déterminant les valeurs de CMI (µg/mL). Les résultats montrent que les réponses sont très variables en fonction de la

souche testée et de la concentration utilisée. Les résultats sont rapportés dans le tableau V.4.

Tableau V.4 : Diamètre des zones d'inhibition (mm).

C (ug/mL)	2.5	5	10	20	40	80
<i>B. Subtilis</i>	7	7	7	8	9	19
<i>S. aureus</i>	8	8	8	9	10	18
<i>P. aeruginosa</i>	7	8	7	7	7	8
<i>E. coli</i>	7	7	7	7	7	10

Ainsi :

- *S. aureus* se montre sensible à très sensible.
- *B. subtilis* montre une légère activité, sensible à C=40 µg/mL.
- *E. coli* et *P. aeruginosa* ont des comportements presque comparables pour l'ensemble des concentrations ; elles sont résistantes.

L'activité antimicrobienne vis-à-vis des souches utilisées peut être attribuée principalement aux constituants majoritaires d'HE.

Par ailleurs, Burt [71] rapporte que la caractéristique importante des huiles essentielles est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ses composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules.

Oussalah [72] suggère que l'action des HEs sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport d'électrons et la production d'énergie.

Le mode d'action des HE dépend du type de microorganismes, de sa concentration. En général, les bactéries Gram négative sont plus résistantes que les bactéries Gram positives de par la structure de leur membrane externe. [73]

Pour ce qui est de CMI, une concentration de 2.5µg/mL est enregistrée avec *B. subtilis* par contre aucune différence est observée pour les autres souches.

Cette inhibition est considérée, selon la classification d'Autore [74] comme très forte

(<500µg/mL), l'HE de *T. polium* semble avoir une activité forte pour *B. subtilis* et faible sur *P. aeruginosa* et *E. coli*.

V.4. Formulation de nano-émulsion

Les conditions optimales pour la production de nano-émulsion huile dans eau utilisées dans cette présente étude ont été déterminées et ont abouti à une formule stable avec les meilleurs caractéristiques. Les résultats ont montré que la formulation 02 est optimale, elle est composée de (7,5) de T80, (1,28) de Glycérol et (0,90) d'HE dans la phase aqueuse. Les valeurs des tailles et la distribution des gouttelettes résultant des conditions optimisées étaient en bon accord avec les valeurs prédites dans la littérature.

IV.4.1. Caractérisation des nano-émulsions

La formulation optimale a présenté un aspect liquide homogène, une couleur transparente avec odeur puissante. La taille de gouttelettes initialement est de $(65 \pm 0.5 \text{ nm})$ avec une distribution de taille étroite ($\text{PDI} = 0,35 \pm 0,05$) et un ZP ($30 \pm 0,5 \text{ mV}$). Cette taille n'a pas été modifiée significativement durant la période de stockage. Des analyses par DLS ont été réalisées chaque semaine afin de déterminer non seulement la taille des particules, mais aussi le degré de stabilité et d'homogénéité de NEs. Dans notre cas le PDI est inférieurs à 1, ce qu'indique que notre distribution est monodisperse.

▪ Mesure du pH

Le contrôle du pH d'une solution permet d'évaluer l'acidité ou l'alcalinité. C'est un point crucial au moment de la préparation des NEs. La valeur du pH trouvée est 5.42 et est satisfaisante par ce qu'elle est compatible avec le pH de la peau.

▪ Analyse microscopique

La résolution du microscope optique n'a pas pu visualiser NEs à cette échelle, les gouttelettes sont fines, de taille homogène et nanométrique. L'observation à une échelle nanométrique nécessite des moyens plus sophistiqués tels que la microscopie électronique à transmission (MET).

▪ Analyse rhéologique

Afin d'estimer les comportements rhéologiques et déterminer la viscosité des NEs, on a eu recours à des analyses rhéologiques.

▪ Test de viscoélasticité

La courbe de viscoélasticité est donnée en termes de G' en fonction de la vitesse de cisaillement γ (%).

Avec :

G' : C'est le module de conservation et il caractérise la réponse en phase avec la déformation. Il est associé à la réponse du comportement élastique (Pa).

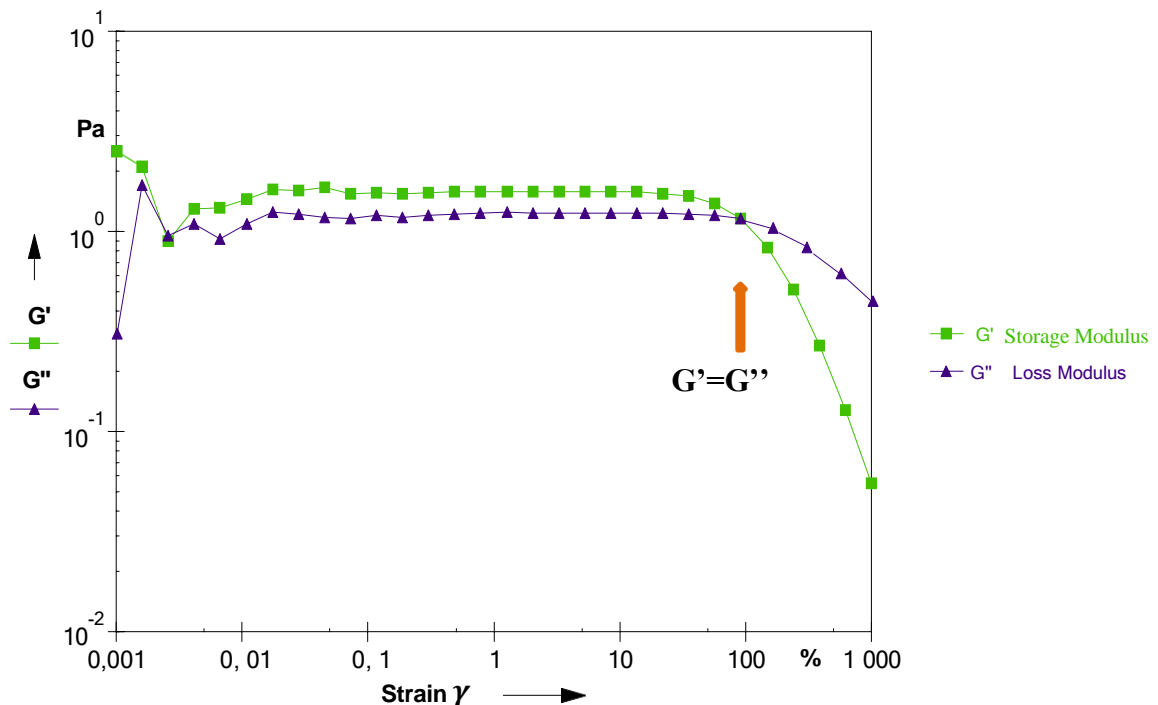


Figure V.2 : Comportement viscoélastique de la NEs.

La zone LVE est définie comme étant la valeur pour laquelle le module G' décrit un plateau pour les faibles déformations.

On observe que l'écart entre G' et G'' est petit ce qui signifie que le comportement de NEs est proche de solide comme un liquide.

➤ Lorsque le module élastique G' est supérieur au module visqueux G'' dans la zone LVE donc notre dispersion est viscoélastique.

➤ Au point de croisement : $G'=G''$, la valeur de déformation ou contrainte seuil représente une valeur de déformation suffisante pour désorganiser les particules et modifier le réseau de particules connectées et obtenir un comportement liquide (inversement de comportement).

Au-delà de cette valeur, pour des déformations élevées, le comportement liquide domine, le module visqueux G'' est plus élevé que le module élastique G' .

➤ On observe bien une décroissance en fonction du taux de cisaillement caractéristique des fluides non Newtoniens.

▪ Test d'écoulement

Dans cette partie de l'étude, des propriétés rhéologiques de NEs sont présentées. L'évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement est donnée dans la figure ci-dessous.

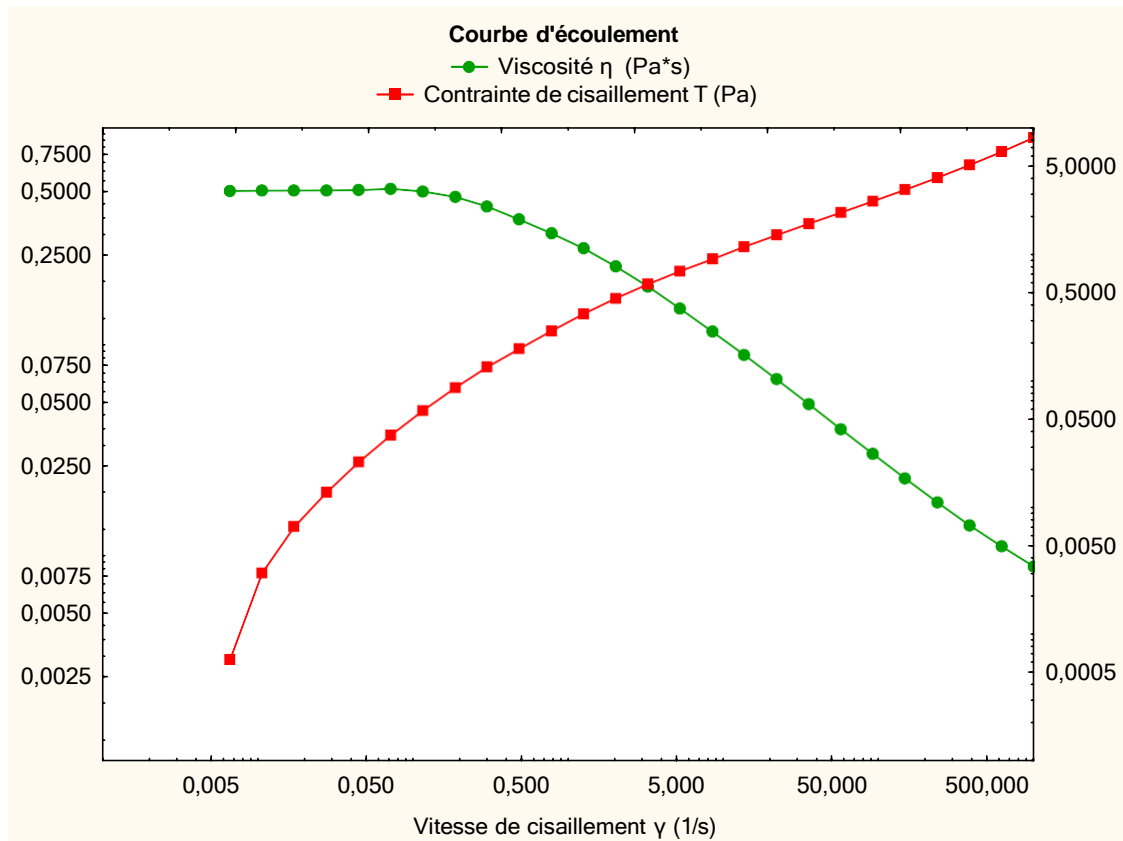


Figure V.3 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement.

On observe deux parties dont l'évolution de la viscosité : un premier domaine caractéristique d'un comportement Newtonien (viscosité constante en fonction de la vitesse de cisaillement) et une deuxième typique d'un système rhéo-fluidifiant (la diminution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement).

▪ Etude de la diffusion en Ex-vivo

Afin d'étudier la diffusion en ex-vivo des NEs, nous avons utilisé une cellule de Franz. A partir des résultats obtenus, on observe au début une libération immédiate du PA suivi d'une libération prolongée (**Figure V.4**), ce profil de libération est obtenu par deux types de NEs. Une population de nanoémulsions à libération intermédiaire qui fait que l'on atteint très rapidement des concentrations élevées en PA dans le système cutané (soulagement rapide), et une libération prolongée, permettent de maintenir des concentrations élevées et quasiment constantes en PA pendant 4 heures (soulagement à court et long terme).

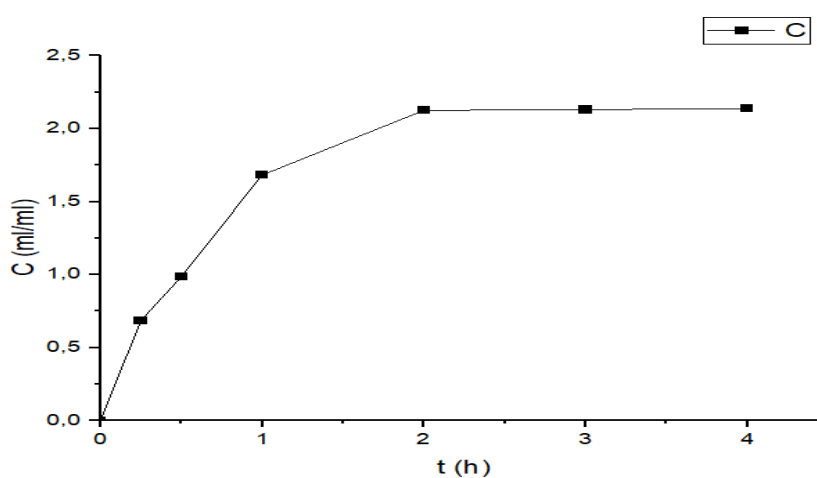


Figure V.4 : Profil de libération de l'HE à travers NEs.

V.5. Préparation des patches

V.5.1. Caractérisations des films

Le choix de nos formulations a été basé sur les caractéristiques visuelles et tactiles (Tableau V.5), de la douceur, de la transparence, de l'adhésion, de l'endurance au pliage, de l'uniformité de l'épaisseur des films obtenus.

Tableau V.5 : Propriétés visuelles et tactiles des films choisis.

Formulation	Douceur	Transparence	Adhésion	Endurance au pliage	Epaisseur (mm)
<i>F1</i>	lisse	Transparent	Non-collant	> 80	0,25±0,005
<i>F2</i>	lisse	Transparent	Non-collant	> 50	0,24±0,005
<i>F3</i>	lisse	Transparent	Non-collant	> 65	0,24±0,03

En effet, les films préparés étaient lisses, transparents, non collants et homogènes (Figure.V.5). Les valeurs des épaisseurs moyennes n'ont pas montré de différences significatives. Toutes les formulations (F1-F3) ont également présenté une excellente endurance au pliage, c'est-à-dire une bonne flexibilité, ce qui facilite leur utilisation.

**Figure V.5 :** Exemple d'une photo prise sur un film à base d'CMC/Gel/PVA.

D'après les résultats obtenus, le choix a opté pour la formulation 1 (F1) qui présente les meilleurs caractéristiques.

Après l'ajout du principe actif (NEs) à la formulation choisi, on a étudié la libération du PA ex-vivo et in vivo.



Figure V.6 : Adhésion des patchs sur le derme ; (a) : patch collé et (b) : décollement du patch.

Les tests d'adhérence du patch sur la peau a été réalisé sur un patient volontaire, on a remarqué une facilité pour se détacher après épuisement du PA.

▪ Etudes structurales par Spectrophotométrie FT-IR

Les spectres FT-IR des formulations étudiées (film, patch) ont été réalisés dans la gamme de nombre d'ondes comprises entre 4000 à 500.

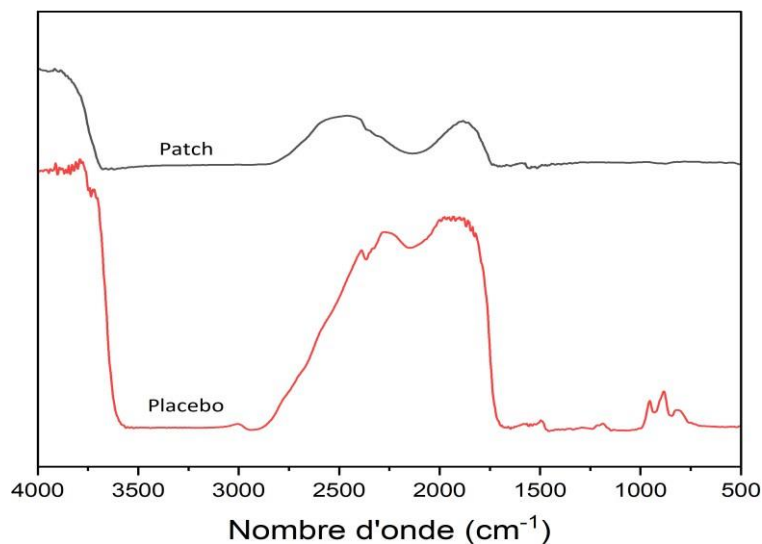


Figure V.7 : Spectres IR-TF de film et du patch.

D'après les spectres obtenus (Figure V.7), la complexité des systèmes étudiés ne peut pas avancer des interprétations rigoureuses du fait de la présence des différents groupements

hydroxyles portés par chacun des biopolymères, la CMC, la gélatine et le PVA. Ces hydroxyles ont l'aptitude de masquer tout type d'interaction entre les différents groupements des différents matériaux utilisés suite à leur forte absorption.

A la lumière de ces spectres, on peut conclure que les composés de la NEs sont présents dans le patch, ceci est justifié par l'apparition de groupements caractéristiques et qui n'existent pas du tout dans le film.

▪ Test de libération ex-vivo

L'étude ex-vivo de la libération de PA à travers le patch (Figure V.8) a montré que la diffusion à travers de la formulation choisie s'est avéré une libération immédiate au début, puis une libération prolongée avec des concentrations presque constantes au bout de 6h pour se libérer complètement au bout de 24 h ce qui est en accord avec le profil de libération souhaitée.

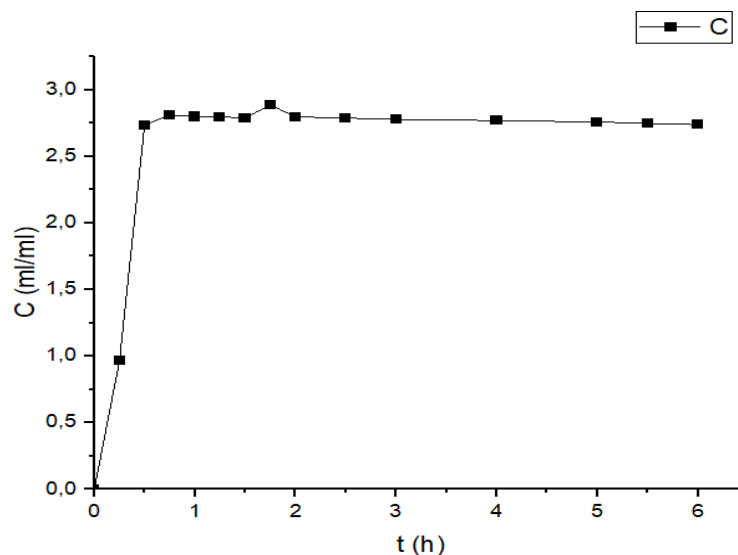


Figure V.8 : Profil de libération du patch.

V.6. Activité cicatrisante in vivo

V.6.1. Evaluation de l'aspect macroscopique des plaies

L'aspect macroscopique et la taille des plaies ont été suivis et évalués quotidiennement durant la période de traitement. Les caractéristiques de la plaie permettent d'apprécier son état et son évolution. La fermeture de la plaie est évaluée par mesure des dimensions de la plaie,

l'inflammation est évaluée par la rougeur.

Dans les conditions naturelles, la contraction est la principale voie de cicatrisation. C'est un phénomène naturel qui facilite grandement le traitement des plaies cutanées étendues. Elle constitue donc un critère d'appréciation macroscopique de l'évolution de la plaie. Les mesures sont effectuées chaque 3 jour pendant une période de 15 jours.

Le pourcentage de contraction des plaies a été calculé selon la formule :

$$\text{Pourcentage de contraction de la plaie} = \frac{\text{Surface initiale } (J_0) - \text{Surface } (J_x)}{\text{Surface initiale } (J_0)} * 100$$

D'une façon générale, on a constaté une réduction des surfaces des plaies dans les quatre lots mais de façon inégale comme le montre les résultats mentionnés sur le tableau ci-dessous.

Tableau V.6 : Pourcentage de contraction des plaies à j18 (%).

Lot	D4	D8	D12	D15	D18
TMN	36.88	73.75	78.5	86.9	89.6
CCT	28.95	54.73	68.98	81.52	91
NEs	29.19	63.33	80.08	92	98.09
Patch	32.33	75.55	94.23	97.46	99.87

A j3 ainsi qu'à j6 les deux lots traités avec la NEs et le patch ne démontrent aucun signe d'infection ou d'inflammation.

Les plaies traitées avec la NEs et le patch ont montré une meilleure évolution que les plaies traitées avec Cicatryl-bio et les plaies témoins (valeur significative aux jours 4, 8, 12, 15, 18). Ce résultat est comparable à celui rapporté par Alahtavakoli (2010) [75] qui a testé l'effet du miel de *Teucrium polium* sur des plaies d'excision, une différence hautement significative a été mise en évidence aux jours 6, 9, 12 et 15. Selon Rasik et Shukla (2001) [76] *Teucrium polium* accélère la cicatrisation grâce à son activité antioxydante en détruisant les radicaux libres au sein de la plaie. Cette haute activité antioxydante est liée aux différentes composantes (Mehrabani et al, 2009). [77]

Les constatations de l'aspect macroscopique des plaies qui apparaissent moins enflammées que les plaies du lot témoin et le lot traité avec Cicatryl-bio, sont comparables à celles rapportées par une étude réalisée par Ansari et al. (2009) [78] sur des brûlures et qui suggèrent que la

plante est capable de moduler la réponse inflammatoire à des degrés variables de sévérité tels que la formation d'œdème, la perméabilité vasculaire. La réponse inflammatoire étant fortement stimulée par la présence de bactéries, virus ou des champignons, (White et Cutting, 2008) [79] il est probable que l'activité antibactérienne de *Teucrium polium* contribue grandement à son activité anti-inflammatoire. Autore *et al*, [74] ont mis en évidence une remarquable activité antibactérienne de l'extrait de *T. polium* contre les bactéries Gram positive et Gram négative. Ces propriétés anti-inflammatoires et anti-bactérienne sont à l'origine d'une atténuation voire une disparition rapide des signes de l'inflammation, à savoir rougeur, chaleur, œdème, et douleur.

Dans notre étude, le traitement améliore significativement le processus de cicatrisation après l'excision chez les rats. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le patch, le traitement a eu un fort impact sur l'épithélialisation des plaies, a accéléré la réparation des tissus et a réduit la durée de ce processus. Cela peut être dû aux effets combinés des constituants bioactifs, principalement les terpènes qui augmentent l'absorption percutanée des médicaments et d'autres composés en raison de leurs caractéristiques lipophiles. Selon Cal et Sopala [80], la concentration maximale de terpènes dans la couche cornée et l'épiderme a été obtenue dans les 15 minutes suivant l'application. Cette biodisponibilité des molécules actives stimule la production cellulaire inflammatoire qui est une étape clé de régulation du processus de cicatrisation des plaies.

**J0****J4****J8****J12****J15****J18**

Figure V. 9 : Aspect des plaies de lot traité avec patch.

Conclusion

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense qui reste à découvrir. Une grande partie de cette flore est constituée par des espèces médicinales et c'est dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules à activités biologiques d'origine végétale, que s'inscrit notre problématique. L'objectif de cette étude est, en l'occurrence, l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de la partie aérienne de la plante *Teucrium polium* L, et de confirmer ces effets cicatrisants.

Dans le premier volet, nous nous sommes intéressés à la prospection phytochimique. L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation a révélé un rendement moyen de (0.66 %). Son analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a mis en évidence la présence de vingt-neuf composés dominés par les composés sesquiterpéniques (73.91%), avec la D-Germacrène (38.36%), la Bicyclogermacrène (13.27%), β -Germacrène (5.65%), δ -Cadinène (4.77%), α -Cadinol (2.97%) les composés ayant les plus hauts pourcentages, contenant ainsi 20.02% de monoterpènes, dont l' α -pinène (3.19%), la β -pinène (4.35%), Sabinene (1.92%), limonène (1.78%) sont majoritaires, la classe de phenylpropane révèle un taux de 4.46% dont le carvacrol (3.58%).

L'étude biologique a mis le point sur les activités antibactériennes et antioxydantes de *Teucrium polium* L. Il a été démontré que l'huile essentielle est plus efficace sur les Gram positifs que Gram négatifs. Les souches, *S. aureus* s'avèrent les plus sensibles par rapport à *E. coli* qui se montre la plus résistante. La valeur des concentrations minimales inhibitrices montre que l'inhibition était de 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

Pour ce qui est de l'activité antioxydante, nous constatons que l'huile essentielle montre une forte activité avec ($IC_{50}=10.314 \mu\text{g/mL}$) en comparaison avec l'acide ascorbique ($IC_{50}=10,211 \mu\text{g/mL}$),

Dans le deuxième volet, nous avons formulé des nanoémulsions d'huile essentielle de *Teucrium polium* L. avec T 80 (7,5), TPO (0,90) et Glycérol (1,28). Les produits ont présenté un diamètre de gouttelettes de ($65 \pm 0.5 \text{ nm}$) avec une distribution de taille étroite ($PDI = 0,35 \pm 0,05$) et un ZP ($30 \pm 0,5 \text{ mV}$). Aucune augmentation de taille n'a été enregistrée pendant toute la période de stockage, ce qui semble conférer à notre système une stabilité. Les propriétés mécaniques des nouveaux patches conçus à base de CMC ont

été améliorées par l'ajout de la gélatine et du PVA.

Les patches supportés par les films de NEs ont montré d'excellents paramètres en matière de qualité, de stabilité et d'efficacité. Ils sont dermocompatibles, adhésifs à la couche dermique et libèrent le principe actif de façon continue dans le temps, résultat confirmé par des tests ex-vivo

Enfin, des études in-vivo sur des rats Wistar ont montré des résultats intéressants quant à la qualité de la cicatrisation des plaies cutanées, qui semble en effet meilleure chez les sujets ayant reçu un traitement avec NEs et le patch. Les signes de l'inflammation dans les plaies traitées avec *Teucrium polium* sont moins marqués. Ces résultats fournissent la preuve matérielle que *T. polium* peut être employé pour favoriser la guérison des blessures dans les blessures mécaniques de peau, qui peuvent être réalisées par des effets antibactériens et antioxydants exercés par des molécules bioactives de la plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'un premier pas dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Plusieurs perspectives s'ouvrent dans cet axe très pertinent :

- Isoler les composés majoritaires de l'huile essentielle afin d'évaluer leurs propriétés biologiques et vérifier les activités biologiques de l'huiles essentielle et de s'en assurer de l'innocuité totale et l'absence de risques toxicologiques de ces composés.
- Incorporer ces composés dans un aliment modèle et d'explorer l'effet isolé et synergique des différents constituants.
- Utiliser des méthodes plus modernes pour l'extraction des principes actifs tellesque l'extraction assistée par microondes, par ultrasons ou par fluide supercritique.
- Elargir le spectre d'activités biologiques ciblées, en incluant l'activité cytotoxique, anti-inflammatoire, antifongique et anticancéreuse ;
- Approfondir l'étude phytochimique, en utilisant des techniques plus performantes pour la détermination de la structure chimique de ces composés par différentes méthodes de séparation et d'identification.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Svoboda K. et Svoboda T.; 2000; Secretory structures of aromatic and medicinal plants; Ed: Microscopix Publications; p: 7-12.
- [2] Verdrager, J., 1978, Ces médicaments qui nous viennent des plantes, Ed. Maloine S.A.p.9-15.
- [3] Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2011). Spices as functional foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 51(1), 13-28.
- [4] Hanifi N. (1991). Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. Inconservation des ressources végétales. Publication d'Actes éditions : 47-49.
- [5] Bahramikia S. & Yazdanparast R. (2012). Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*, 26(11): 1581-1593.
- [6] Haifa Chtourou. Houcine Bendaoud. Hmed Ben Nasr. Zouheir Sahnoun. *Teucrium polium*: a promising source of molecules with a wound healing effect and biological activities. 2023, Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration
- [7] Sabz Gh, et al. Chemical Composition and Antimicrobial Properties of *Teucrium polium* Essential Oil Collected from Dena Mountain in Yasuj, Iran. *Journal of Clinical Care and Skills*. 2022 ;3(3):125-132
- [8] Sharifi-Rad, M.; Pohl, P.; Epifano, F.; Zengin, G.; Jaradat, N.; Messaoudi, M. *Teucrium polium* (L.): Phytochemical Screening and Biological Activities at Different Phenological Stages. *Molecules* 2022, 27, 1561.
- [9] Waad A. Al-Otaibi & Sahar M. AlMotwaa (2022) Oxaliplatin-loaded nanoemulsion containing *Teucrium polium* L. essential oil induces apoptosis in Colon cancer cell lines through ROS-mediated pathway, *Drug Delivery*, 29:1, 2190-2205.

- [10] Waad A. Al-Otaibi* and Sahar M. AlMotwaa (2022) Chemical composition and antioxidant, antibacterial and cytotoxic properties of essential oil from *Teucrium polium* L. from Riyadh province Emirates Journal of Food and Agriculture. 2022. 34(1): 26-35.
- [11] Sarra Chabane , Amel Boudjelal , Edoardo Napoli , Abderrahim Benkhaled & Giuseppe Ruberto (2020): Phytochemical composition, antioxidant and wound healing activities of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. essential oil, Journal of Essential Oil Research.
- [12] Al-Otaibi, W. A., & AlMotwaa, S. M. (2023). Preparation, characterization, optimization, and antibacterial evaluation of nano-emulsion incorporating essential oil extracted from *Teucrium polium* L. Journal of Dispersion Science and Technology, 44(6), 922–932.
- [13] Chabane, S., Boudjelal, A., Keller, M., Doubakh, S., & Potterat, O. (2021). *Teucrium polium*-wound healing potential, toxicity and polyphenolic profile. *South African journal of botany*, 137, 228-235.
- [14] Fallah Huseini, H., Abdolghaffari, A. H., Ahwazi, M., Jasemi, E., Yaghoobi, M., & Ziaee, M. (2019). Topical Application of *Teucrium polium* Can Improve Wound Healing in Diabetic Rats. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 153473461986862.
- [15] Gurib-Fakim A. (2006) Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- [16] Hartmann, T., (2007). From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry* 68 2831–2846.
- [17] Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., Curini, M., (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites, Review. *Phytochemistry* 68,939- 953.
- [18] Möller K., 2008 : La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial Unico.152 P.
- [19] Teusher E., Anton R. et Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, p 522.
- [20] Bruneton, J., 1993. "Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales". 2^{ème} édition, Lavoisier Tec Doc, Paris, 915p.

- [21] Pibiri M.C, 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p :177.
- [22] Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi, M.S., Ghorbani A. (2005). Labiateae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian J. Pharmaceut. Res.* 2: 63-79.
- [23] Rameau, J. C., Mansion, D., & Dumé, G. (2008). Flore forestière française: guide écologique illustré. Région méditerranéenne (Vol. 3). Forêt privée française.
- [24] Boullard, B. (2003). Plantes médicinales du monde : réalités et croyances. Paris. pp. 1092-1107.
- [25] Ozenda, (2004). Flore et végétation du Sahara. 3^{ème} édition, CNRS Éditions, Paris.
- [26] Quezel, P., Santa, S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, Paris.
- [27] Sahki, A., Sahki, R., (2004). Le Hoggar: Promenade botanique. Atelier Ésope. Chamonix, pp. 110
- [28] Elmasri W. A., Hegazy M-E. F., Aziz M., Koksai E., Amor W., Mechref Y., Hamood A. N., Cordes D. B. and Paré P. W. (2014). Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. *Phytochemistry*, 103:107-113.
- [29] El Oualidi J., Rascol J. P., Martin A. et Puech S. (1996). Le Poliumoside marqueur chimique de la section Polium du genre *Teucrium* (Labiatae) à l'exception du *Teucrium mideltense* espèce endémique du Maroc. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(3), 261 - 272.
- [30] Ashnagar A., Gharib Naseri N., Foroozanfar S. (2007). Isolation and Identification of the Major Chemical Components Found in the Upper Parts of *Teucrium Polium* Plants Grown in Khuzestan Province of Iran. *Chinese Journal of Chemistry*, 25, 1171-1173.
- [31] Esmaili M. A. and Yazdanparast R. (2004). Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(1):27-30.

- [32] Autore, G., F. Capasso, De Fusco, R. Fasulo, M. P. Lembo, M. Mascolo, N. Menghini, A. (1984). Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* L. *Pharmacological Research Communications*, 16(1): 21-29.
- [33] Panovska T. K. and Kulevanova S. (2005). Effect of some *Teucrium* species (*Lamiaceae*) on lipid peroxidation in rat liver microsomes, *Fresenius Environmental Bulletin*, 14, 957–959.
- [34] Hasani P., Yasa N., Vosough-Ghanbari S., Mohammadirad A., Dehghan G., Abdollahi M. (2007). *In vivo* antioxidant potential of *Teucrium polium*, as compared to α -tocopherol. *Acta Pharmaceutica*, 57, 123–129.
- [35] Khani A. & Heydarian M. (2014). Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 956-961.
- [36] Barceloux D. G. (2008). *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, & Venomous Animals*. New Jersey: John Wiley and Sons.
- [37] Lekehal M., Pessayre D., Lereau J. M., Moulis C., Fouraste I. & Fau D. (1996). Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A depletes cytoskeleton - associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. *Hepatology*, 24:212-218.
- [38] J. Kreuter, —Nanoparticles—a historical perspective, *Int. J. Pharm.*, vol. 331, no. 1, pp. 1–10, Feb. 2007.
- [39] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the « Gold Book »). Compil McNaught Wilkinson Blackwell Sci Publ Oxf 1997. XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata.
- [40] Shah P, Bhalodia D, Shelat P. Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review. *Syst Rev Pharm.* janv 2010;1(1):24–32.
- [41] Gaulin A. Process of treating milk or similar liquids [Internet]. US753792A, 1904 [cité 30 mars 2019]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US753792A/en>.
- [42] Periasamy VS, Athinarayanan J, Alshatwi AA. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa* L. essential oil on human breast cancer cells. *Ultrason Sonochem.* juill 2016;31:449–55.

- [43] Jafari SM, He Y, Bhandari B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *J Food Eng.* 1 oct 2007;82(4):478-488.
- [44] Laouini A, Fessi H, Charcosset C. Membrane emulsification: A promising alternative for vitamin E encapsulation within nano-emulsion. *J Membr Sci.* 15 déc 2012;423-424:85-96.
- [45] Saberi AH, Fang Y, McClements DJ. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *J Colloid Interface Sci.* 1 févr 2013;391:95-102.
- [46] Anton N, Vandamme TF. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int J Pharm.* 30 juill 2009;377(1):142-7.
- [47] Solans C, Solé I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 1 oct 2012;17(5):246-54.
- [48] McClements DJ, Jafari SM. Chapter 1 - General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. In: Jafari SM, McClements DJ, éditeurs. *Nanoemulsions Academic Press*; 2018 [cité 18 mars 2019]. p. 3-20.
- [49] McClements DJ, Rao J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 25 mars 2011;51(4):285-330.
- [50] Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 20 mai 2004;108-109:303-18.
- [51] Howe AM, Pitt AR. Rheology and stability of oil-in-water nanoemulsions stabilised by anionic surfactant and gelatin 1) addition of nonionic, cationic and ethoxylated-cationic co-surfactants. *Adv Colloid Interface Sci.* 2 déc 2008;144(1-2):24-9.
- [52] McClements D. J., Rao J. I., 2011. Food-grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 285-330.
- [53] Tscharnuter, W., 2000. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. In: Meyers, R. A., *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation* 7, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 5469-5485.
- [54] McClements, D. J., 1999. *Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques*, (2nd ed.). Boca Raton, Florida, U.S.A.: CRC Press.
- [55] Klang, V., Matskob, N. B., Valenta, C., Hofer, F., 2012. *Electron Microscopy of*

- Nanoemulsions: An Essential Tool for Characterisation and Stability Assessment. *Micron* 43, 85-103.
- [56] Gallarate, M., Chirio, D., Bussano, R., Peira, E., Battaglia, L., Baratta, F., Trotta, M., 2013. Development of O/W Nanoemulsions for Ophthalmic Administration of Timolol. *International Journal of Pharmaceutics* 440, 126-134.
- [57] Chetouani A, Follain N, Marais S, Rihouey C, Elkolli M, Bounekhel M, Benachour D & Le Cerf D (2017) Physicochemical properties and biological activities of novel blend films using oxidized pectin/chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules* 97:348–356.
- [58] F. Aude, Des formes topiques classique aux formes transdermiques : formulation et procédés, *Sciences pharmaceutiques*, 2006
- [59] B. W. Barry, Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal Of Pharmaceutical sciences*, 14 : 101-114, 2001.
- [60] Dipen Patel; Sunita A. Chaudhary; Bhavesh Parmar; Nikunj Bhura, “Transdermal Drug Delivery System: A Review,” *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.*, vol. 1, no. 4, pp. 66–75, 2012.
- [61] Han, T.; Das, D.B. Potential of Combined Ultrasound and Microneedles for Enhanced Transdermal Drug Permeation: A Review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015, 89, 312–328.
- [62] A. Z. Alkilani, M. T. C. McCrudden, and R. F. Donnelly, “Transdermal drug delivery: Innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum,” *Pharmaceutics*, vol. 7, no. 4, pp. 438–470, 2015.
- [63] Y. Chen, P. Quan, X. Liu, M. Wang, and L. Fang, “Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 9, no. 2, pp. 51–64, 2014.
- [64] K. A. Walters, W. K. A., and R. M. S., *Dermatological and Transdermal Formulations*. 2002.
- [65] J. A. Kumar, et al, Transdermal drug delivery system: an overview, *International journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, Vol. 3, 2, 2010.
- [66] Timizar, Z.; Boutemak, K.; Hadj Ziane-Zafour, A.; Touzout, N.; Tahraoui, H.; Jaouadi, B.; Zamouche, M.; Kebir, M.; Zhang, J.; Amrane, A. Comprehensive Analysis of Phytochemical Composition, Antioxidant Potential, and Antibacterial Activity of *T. polium*. *Separations* 2024.

- [67] MANSOURI Lamia ; Thèse de doctorat, Université Ferhat ABBAS - SETIF1, 2019.
- [68] Habib F, Abdel Azeem M, Fetih G & Safwat M (2017) Mucoadhesive buccal patches of lornoxicam: I- Development and in-vitro characterization. *Bulletin Pharmaceutical Sciences* 33(1):59-68.
- [69] Sadeghi H., Jamalpoor S., Shirzadib M. H. (2014). Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations. *Industrial Crops and Products*, 54:130-134.
- [70] Goulas V., Gomez-Caravaca A. M., Exarchou V., Gerothanassis I. P., Segura-Carretero A., Gutiérrez A. F. (2012). Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 04-109.
- [71] Burt S. A., 2004. Essential oils : their antimicrobial proprieties and potentiel application in foods. *International Journal of Food Microbiology*, vol 94 (3), p 22-25.
- [72] Oussalah M., Caillet S., Saucier L. et Iacroix M., 2006. Mechanism of action of spanish oregano, Chinese cinnamon and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, vol 69 (5), p 1046-1055.
- [73] Chao S.C., Young D.G. et Oberg G. J., 2000 : Screening for Inhibitory Activity of Essential Oils on Selected Bacteria, Fungi and Viruses. *J. Essent. Oil Res.*, Vol. 12, (Sep/Oct 2000), pp : 639-649.
- [74] Autore, G., F. Capasso, R. De Fusco, M.P. Fasulo, M. Lembo and N. Mascolo, 1984. Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* (L.). *Pharmacological Research Communications* 16 (1), pp. 21-29.
- [75] Alahtavakoli A., Vazirinejad R., Ansari Jaber A., Negahban T., Mashayekhi H., Nazari M., Ghoreishi S., Nematollahi F. Effect of *Teucrium polium* extract on skin wound healing in rat, 2010.
- [76] Rasik A.M., Shukla A.. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J Exp Pathol*, 2001, 81: 257–263.
- [77] Mehrabani D., Rezaee A., Azarpira N., Fattahi M.R., Amini M., Tanideh N. The healing effects of *Teucrium polium* in the repair of indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Saudi Med Journal*, 2009, 30 : 494-499.

REFERENCES

[78] Ansari M., Alizadeh A.M., Paknejad M., Khaniki M., Naeimi S.M. Effects of Teucrium Polium Honey on Burn Wound Healing Process. Journal Babol Univ Med Sci, 2009, 11 : 3.

[79] **White R., Cutting K.** Critical colonisation of chronic wounds: microbial mechanisms. Wounds UK, 2008, Vol 4, No 1.

[80] White R., Cutting K. Critical colonisation of chronic wounds: microbial mechanisms. Wounds UK, 2008, Vol 4, No 1.